

**CD303 (BDCA-2):
Funktionelle Charakterisierung eines
spezifischen C-Typ-Lektins humaner
plasmacytoider dendritischer Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs Biologie und Geographie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Jürgen Röck
aus Köln

Dezember 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach durchgeführt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. R. Küppers

2. Gutachter:

Prof. Dr. R. Grümmer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Prof. Dr. H. Esche

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2008

Auszüge der vorliegenden Arbeit sind im folgenden Fachartikel veröffentlicht:

Rock J, Schneider E, Grun JR, Grutzkau A, Kuppers R, Schmitz J und Winkels G (2007). CD303 (BDCA-2) signals in plasmacytoid dendritic cells via a BCR-like signalosome involving Syk, Slp65 and PLCgamma2. Eur J Immunol. 37:3564.

Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDCA	blood dendritic cell antigen
BLNK	B cell linker
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CHC	schwere Clathrin-Kette
CME	clathrin-mediated-endocytosis
CpG	DNA-Oligonukleotide mit unmethylierten CpG Motiven
CRD	Kohlenhydraterkennungsdomäne
DAG	Diacylglycerol
DAP	DNAX activation protein
DC	dendritische Zelle
DCIR	DC Immunorezeptor
Dectin-2	DC-assoziiertes C-Typ Lektin
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbenstest
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor-of- κ B
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase
ITAM	immunoreceptor-tyrosine-based-activating-motif
ITIM	immunoreceptor-tyrosine-based-inibitory-motif
MACS	magnetische Zellsortierung
mAK	monoklonale Antikörper

MALDI	matrix-assisted UV laser desorption/ionization
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	nuclear factor of κ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAGE	Poly-Acryl-Amid-Gelelektrophorese
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDC	plasmacytoide dendritische Zellen
PE	R-Phycoerythrin
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SLE	systemischer Lupus erythematosus
SLP65	Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 65 kDa
SSC	Seitwärtsstreulicht
Syk	spleen tyrosine kinase
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOF	time of flight
TRAF	TNF receptor associated factor
U	Einheit

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Dendritische Zellen	2
1.3 Toll-like-Rezeptoren	5
1.4 C-Typ-Lektine	7
1.5 CD303 – „Blood Dendritic Cell Antigen 2“ –	9
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Kultivierung von HEK-293T-Zellen	12
2.2 Kultivierung von Jurkat-Zellen und PDC	12
2.3 Durchflußzytometrie	12
2.4 Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)	14
2.5 Aufreinigung von Leukozyten aus Leukapherese-Produkten	14
2.6 Magnetische Zellsortierung – MACS –	15
2.7 Immunopräzipitation	16
2.8 ELISA	17
2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung	17
2.10 SDS-PAGE	18
2.11 Immunoblot-Analyse	18
2.12 Microarray-Analyse	19
2.13 mRNA-Präparation	21
2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
2.15 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	22
2.16 DNase Verdau	23
2.17 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	23

2.18	Reverse Transkription	23
2.19	Semi-quantitative Reverse Transkription-(RT)-PCR	24
2.20	Klonierungsstrategie	26
2.21	Transfektion von HEK-293T-Zellen	27
2.22	2D-Gelelektrophorese	27
2.23	Trypsin-Verdau im Gel	28
2.24	MALDI-TOF – Massenspektrometrie von Peptiden	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Microarray-Analyse	30
3.2	Tyrosinphosphorylierungssignatur	35
3.3	CD303 Signalosom	39
4	DISKUSSION	52
5	LITERATURVERZEICHNIS	62
6	ANHANG	70
6.1	Sequenzen	70
6.1.1	Nukleinsäuresequenz von pRc/CMV2-BDCA-2	70
6.1.2	Nukleinsäuresequenz des Klonierungsfragments CD303 mit CLEC4D–TM	70
6.1.3	Nukleinsäuresequenz des Klonierungsfragments CD303 mit CLEC4A–TM	71
6.2	Genregulationsdaten der Microarray-Analyse	72

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Vertebraten wird untergliedert in das angeborene und adaptive Immunsystem. Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Eliminierung von eingedrungenen Pathogenen wie Bakterien, Viren oder Mikroorganismen aber auch in der Detektion von entarteten Zellen, die als „Nicht-Selbst“ erkannt und beseitigt werden. Im adaptiven Immunsystem spielen drei Zelltypen eine zentrale Rolle: B-Zellen, T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen (APC). B- und T-Zellen prägen auf ihrer Zelloberfläche Rezeptoren aus, die antigenspezifisch sind und „Selbst“ im Regelfall nicht erkennen. Dabei kommt es zu Genumlagerungen für den B-Zell-Rezeptor (BCR) und den T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex, welche für die einzigartige Antigenspezifität dieser Rezeptoren verantwortlich sind und somit eine große Diversität ermöglichen. Während B-Zellen das Antigen direkt erkennen und internalisieren können, benötigen T-Zellen, dessen TCR nur Antigen-Peptide präsentiert in Form beladener Haupthistokompatibilitäts-(MHC)-Moleküle erkennt, APC, um antigenspezifische Effektorfunktionen auszuüben. Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen (DC) werden zu den APC gezählt. Während alle kernhaltigen Zellen MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche tragen, sind APC in der Lage, MHC-II Moleküle auszuprägen. Diese Eigenschaft ermöglicht die Präsentation von endosomal aufgenommenem Antigen exogenen Ursprungs über MHC-II-Moleküle, während die Präsentation von Peptiden auf MHC-I-Molekülen primär auf endogen vorliegende Antigene beschränkt ist. Die Präsentation von Antigen über MHC-I-Moleküle führt zu einer Präsentation des Peptids für CD8 ausprägenden cytotoxischen T-Zellen, während die Präsentation von Antigen über MHC-II-Moleküle CD4 positive T_{Helfer}-Zellen dirigiert. Die klonale Expansion von einzelnen antigenspezifischen T-Zellen, nachdem die Zellen das Antigen über eine APC präsentiert bekommen haben, ist ein weiteres Charakteristikum der adaptiven Immunantwort genauso wie das dabei entstehende immunologische Gedächtnis, das ein schnelles Reagieren

des Organismus auf eine zweite Infektion mit dem gleichen Antigen ermöglicht.

1.2 Dendritische Zellen

Phänotypisch werden humane DC als Leukozyten definiert, die MHC-II ausprägen und negativ für die Oberflächenmarker CD3, CD14, CD16, CD19 und CD56 sind. Diesem Phänotypus entspricht circa ein Prozent der Leukozyten des peripheren Blutes. DC sind in der Lage, Antigen zu erkennen, es aufzunehmen und zu prozessieren sowie es über MHC-Moleküle zu präsentieren [Steinman 1991]. Dies ist die Voraussetzung für eine T-Zell-spezifische Immunantwort. Man unterscheidet zwischen myeloiden (MDC) und plasmacytoiden DC (PDC) [O'Doherty et al. 1994]. MDC werden auch als konventionelle DC bezeichnet. DC entwickeln sich aus CD34+ hämatopoetischen Stammzellen. Sie migrieren aus dem Knochenmark in die Peripherie, wo sie in einem unreifen Stadium vorliegen. Die Terminologie einer unreifen DC beschreibt die Fähigkeit zur Phagozytose, die mit einer geringen Ausprägung von MHC-II- und ko-stimulatorischen Molekülen einhergeht [Banchereau und Steinman 1998]. DC-Reifung bezeichnet den Erwerb der Fähigkeit, naive T-Zellen zur Proliferation anzuregen, was phänotypisch mit der gesteigerten Ausprägung von MHC-II und ko-stimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 auf der Oberfläche sowie mit dem Verlust der phagozytären Kapazität einhergeht. Früher wurde die Reifung einer DC gleichgesetzt mit dem Erwerb von Immunogenität, welche sich in der Initiierung einer T-Zell Expansion widerspiegelte. Da tolerogene T-Zellen nach Kontakt mit DC jedoch auch proliferieren, beschreibt die Reifung einer DC heute nur die phänotypisch analysierbare Ausprägung von MHC-II, CD40, CD80, CD83 und CD86 unabhängig vom funktionellen Immunitätsgrad des präsentierten Antigens [Steinman et al. 2003]. Antigenaufnahme und Prozessierung gehören zu den Grundeigenschaften einer DC und führen neben Cytokinen und Chemokinen zur DC-Ausreifung. Nach Ausreifung wandern die DC aus der Peripherie in die lymphatischen Organe, wo neben T-Zellen wahrscheinlich auch B-Zellen und NK-Zellen aktiviert werden können.

Phänotypisch werden MDC als CD11c⁺, CD33⁺ und CD45RO⁺ Zellen von PDC als CD11c⁻, CD123⁺ und CD45RA⁺ Zellen unterschieden.

Dzionic et al. generierten monoklonale Antikörper (mAk), die es ermöglichen, einzelne Subpopulationen von Blut-DC im Menschen zu differenzieren [Dzionic et al. 2000, Dzionic et al. 2002, Dzionic et al. 2001]. Zwei der dabei generierten mAk erkannten für PDC des menschlichen Blutes spezifische Antigene, die mit BDCA-2 und BDCA-4 (engl. „Blood Dendritic Cell Antigen“) bezeichnet wurden. Bei BDCA-4 handelt es sich um Neuropilin-1, einen Rezeptor für Wachstumsfaktoren der Semaphorin-Familie, die eine Rolle bei der axonalen Dendriten-Ausbildung spielen. Die Ausprägung von Neuropilin-1 wird auch von einigen Tumoren berichtet, wo es als Ko-Rezeptor für VEGF165 (engl. „Vascular endothelial growth factor“) [Soker et al. 2002] fungiert.

PDC weisen eine plasmazellartige Morphologie auf und wurden zum ersten Mal von Lennert und Remmele beschrieben als Zellen innerhalb der T-Zell-Zone humaner lymphoiden Gewebes, denen jedoch Marker für Plasma- und B-Zellen fehlten [Lennert und Remmele 1958]. PDC wurden aufgrund der Ausprägung der pre-TCR- α Kette auch als plasmacytoide T-Zellen oder aufgrund monozytoider Marker als plasmacytoide Monozyten bezeichnet [Galibert et al. 2001]. O'Doherty et al. identifizierten im humanen Blut CD11c⁻ unreife DC, die sich durch schwache Ausprägung von MHC-II-Molekülen und geringem T-Zellproliferierungskapazität auszeichneten [Facchetti et al. 1989b, Facchetti et al. 1988]. Diese Zellen können nur in Gegenwart von Interleukin-(IL)-3 in der Zellkultur überleben und differenzieren in Gegenwart von CD40-Ligand zu reifen DC [Cella et al. 1999, Siegal et al. 1999]. PDC des peripheren Blutes prägen CD62L und die Chemokin-Rezeptoren CCR-1, -2, -5, -7 sowie CXCR-3 und CXCR-4 aus [Penna et al. 2001, Penna et al. 2002, Vanbervliet et al. 2003, Yoneyama et al. 2004]. PDC verbinden das angeborene und adaptive Immunsystem hauptsächlich in ihrer Eigenschaft als Cytokin- und Chemokin-Produzenten. PDC werden aufgrund ihrer Fähigkeit, große Mengen Interferon-Typ-I (IFN-I) beispielsweise nach viralem oder mikrobiellen Stimulus zu sezernieren, auch als Interferon-Produzierende-Zellen bezeichnet [Perussia et al. 1985, Svensson et al. 1996]. Das von PDC produzierte IFN-I aktiviert NK-

Zellen [Trinchieri et al. 1978] und spielt eine Rolle bei der Plasmazelldifferenzierung und Antikörperproduktion [Jego et al. 2003, Poeck et al. 2004].

Die Ausprägung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 sowie von CD4 waren Ausgangspunkt für Untersuchungen von PDC in HIV- und AIDS-Patienten. Immunohistochemische Färbungen bestätigten, dass PDC von HIV direkt infiziert werden [Fong et al. 2002] und dass Viruslast und PDC-Frequenz invers zueinander korrelieren [Chehimi et al. 2002, Feldman et al. 2001]. Daneben gilt Systemischer Lupus erythematoses (SLE) als eine typische, von PDC-Dysfunktion geprägte Krankheit. Therapien von metastasierenden Karzinomen mit IFN-I führten bei einigen Patienten zur Ausprägung von SLE-Symptomatik [Ronnblom et al. 1990]. Seren von SLE-Patienten weisen häufig erhöhte IFN-I Konzentrationen auf [Blanco et al. 2001, Rönnblom und Alm 2001]. Die PDC-Frequenz im peripheren Blut sinkt, während es zu Infiltrationen von PDC in Hautläsionen von SLE-Patienten kommt [Cederblad et al. 1998, Farkas et al. 2001]. Dabei können PDC mit Komplexen bestehend aus DNA und anti-doppelsträngiger-DNA-Antikörper aus apoptotischen Zellen, ein Merkmal von SLE, zur IFN-I-Produktion angeregt werden [Dzionek et al. 2001, Vallin et al. 1999]. Daneben sind SLE-Seren in der Lage, IFN-I-abhängig DC zu aktivieren und eine T-Zell-vermittelte Autoimmunität auszulösen [Blanco et al. 2001].

Die Ausprägung von Rezeptoren, die konservierte molekulare Strukturen von Pathogenen erkennen können (engl. „pattern recognition receptors“ – PRR –), ermöglicht es DC, Antigene aufzunehmen und gleichzeitig inflammatorische Prozesse zu bewerten. Zu den PRR-Liganden gehören Lipide, Peptidoglykane, Kohlenhydrate und Nukleinsäuremotive. Die Bindung eines PRRs mit seinem Liganden führt dabei zu Signaltransduktion, was typischerweise die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und die Ausprägung von ko-stimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der DC zur Folge hat [Trinchieri und Sher 2007]. Unterschiedliche Proteinklassen werden zu den PRRs gezählt, zum einen RIG-1- und Mda5-Helikasen, die spezifisch virale Nukleinsäuren

erkennen, die Familie der „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) sowie die Familie der C-Typ-Lektine [Geijtenbeek et al. 2004].

1.3 Toll-like-Rezeptoren

Das Toll-Protein in *Drosophila melanogaster* wurde aufgrund seiner Rolle bei der Dorso-Ventral-Achsen-Bildung während der Embryogenese untersucht. Später zeigte sich, dass das Genprodukt auch eine wichtige Rolle im Immunsystem des Invertebraten spielt, nämlich bei der Abwehr von Pilzinfektionen [Lemaitre 2004, Lemaitre et al. 1996]. TLRs sind evolutionär konservierte Proteine [Akira und Takeda 2004, Janeway und Medzhitov 2002].

Tabelle 1: Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden modifiziert nach [Akira und Takeda 2004]

„Toll-like“-Rezeptor	Ligand
TLR-1/TLR-2	Tri-Acyl-Lipopeptide
TLR-2	Peptidoglykan, Lipopeptide, Zymosan, Glykolipide
TLR-3	dsRNA
TLR-4	LPS, Taxol, bakterielles HSP60
TLR-5	Flagellin
TLR-6/TLR-2	Di-Acyl-Lipopeptide
TLR-7	Imidazoquinolin, Loxoribin (synthetisch)
TLR-8	ssRNA
TLR-9	unmethylierte CpG-DNA
TLR-10	unbekannt
TLR-11	bakterielles Profilin

Derzeit sind 11 TLRs in Säugern identifiziert worden, von denen TLR1-9 spezies-unabhängig funktional erscheinen [Akira und Takeda 2004]. Eine Übersicht der TLRs und ihrer Liganden bietet Tabelle 1. TLRs sind Typ-I-integrale-Glykoproteine der Zellmembran oder endosomaler Kompartimente und weisen alle in unterschiedlicher Ausprägung Leucin-reiche-Wiederholungssequenzen auf (engl. „leucine-rich-repeats“ (LRR)). Die genaue Konformation dieser LRR in Zusammenhang mit der Bindung der natürlichen Liganden der TLRs ist bisher unbekannt [Akira und Takeda 2004]. Die TLRs besitzen eine cytoplasmatische Signaldomäne, die konserviert zur Signaldomäne des Interleukin-(IL)-1-Rezeptors ist (TIR-Domäne) [Bowie und

O'Neill 2000]. Aufgrund der Sequenzen ihrer Aminosäuren (AS) kann die Gruppe der TLRs weiter untergliedert werden, wobei die Gruppen ähnliche PAMPs erkennen. Die eine Gruppe, bestehend aus TLR1, 2 und 6, erkennt Lipide, während die Gruppe mit TLR7, 8, 9 Nukleinsäuren erkennt. Daneben gibt es Ausnahmen wie der TLR4, für den mit LPS, Mannan, Glycoinositolphospholipide sowie HSP-60 und -70 (engl. „heat-shock protein“) Liganden unterschiedlicher biochemischer Komposition gefunden wurden [Hoshino et al. 1999, Poltorak et al. 1998]. TLRs bilden Homo- und Heterodimere miteinander, wobei die Signaltransduktionsmechanismen gut charakterisiert sind [Akira und Takeda 2004].

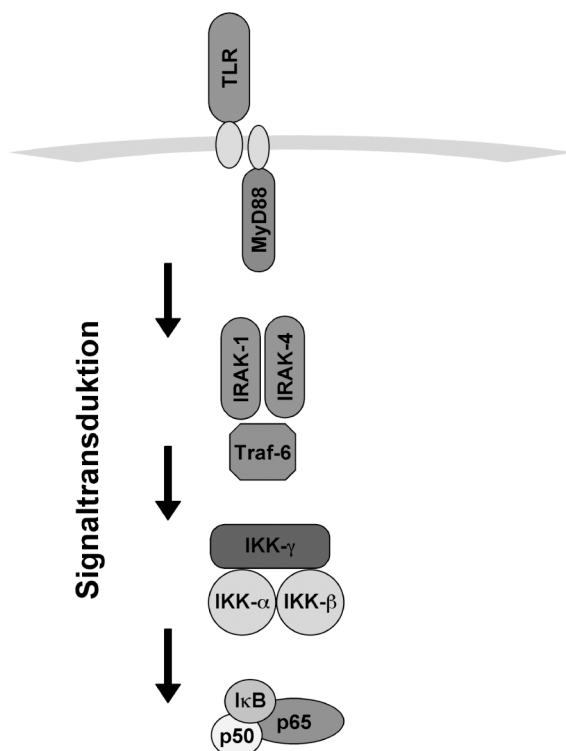


Abbildung 1: Modell der Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktion modifiziert nach [Akira und Takeda 2004]

Toll-like-Rezeptoren (TLRs) bilden Homo- und Heterodimere. Die durch die Bindung eines Liganden initiierte Signaltransduktion beruht mit der Ausnahme von TLR-3 auf der Interaktion der TIR-Domäne des TLR und der TIR-Domäne von MyD88 (engl. „myeloid differentiation primary response gene 88“). Nach Aktivierung rekrutiert MyD88 die IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase-4 (IRAK-4) und IRAK-1, wobei diese Kinasen aktiviert werden. Dies führt wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung des Tumornekrosefaktor-(TNF)- α -assoziierten-Faktors-6 (TRAF6). TRAF6 fungiert als E3-Ubiquitin-Protein-Ligase und initiiert die Polyubiquitinierung (Typ-K63) von IKK- γ , was in der Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges mündet.

Die Abbildung 1 zeigt das Modell der TLR-Signaltransduktion. Die durch die Bindung eines Liganden initiierte Signaltransduktion beruht mit der Ausnahme von TLR-3 auf der Interaktion der TIR-Domäne des TLR und der TIR-Domäne von MyD88 (engl. „myeloid differentiation primary response gene 88“). Nach seiner Aktivierung rekrutiert MyD88 die IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase-4 (IRAK-4) und IRAK-1. Nach der Phosphorylierung und Aktivierung von IRAK-1 rekrutiert diese Kinase wiederum den Tumornekrosefaktor-(TNF)- α -assoziierten Faktor-6 (TRAF6) zum Komplex. TRAF6 fungiert als E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, welche nach Interaktion mit einem E2-Ubiquitin-Ligase-Komplex bestehend aus UBC13 und UEV1A die Inhibitor-of- κ B-Kinase-Kinase (IKK)- γ K63-polyubiquitiniert und somit zur Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges führt [Akira und Takeda 2004]. Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges wird mit der Induktion pro-inflammatorischer Cytokine und ko-stimulatorischer Moleküle in Verbindung gebracht [Trinchieri und Sher 2007]. Ein weiterer Aspekt der TLR-Bindung ist die Ausreifung von Phagosomen. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von TLR2/4 Signalen die Endozytose von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* unvollständig verläuft, da die entstehenden Phagosome unvollständig ausreifen [Blander und Medzhitov 2004]. Somit erweist sich TLR-Signalgebung als wichtiger Bestandteil der Phagocytose, die häufig mit der C-Typ-Lektin-Familie als sogenannte Antigenaufnahmerezeptoren in Verbindung gebracht wird.

1.4 C-Typ-Lektine

C-Typ-Lektine binden Calcium-abhängig Kohlenhydrate unter Verwendung von konservierten Kohlenhydrat erkennenden Domänen (engl. „Carbohydrate recognition domains“ (CRDs)). Diese CRDs umfassen eine Calcium bindende Tasche, die für die Bindung des Kohlenhydrat-Liganden essentiell ist. C-Typ-Lektine werden entweder membranständig ausgeprägt oder liegen als lösliche Proteine vor. Zu letzteren gehören die Kollektine SP-A und SP-D (engl. „lung surfactant proteins“), die von Lungenepithelzellen in das Lumen sezerniert werden, sowie das Mannose bindende Plasmaprotein MBP [Wintergerst et al. 1989]. Kollektine können die Opsonisierung von Pathogenen vermitteln und mit

dem Komplementsystem das Pathogen neutralisieren [Holmskov et al. 2003]. Neben löslichen Lektinen gibt es eine wachsende Zahl membranständiger C-Typ-Lektine, die speziell von DC ausgeprägt werden. C-Typ-Lektinrezeptoren weisen dabei die typische Faltung bestehend aus zwei anti-parallelen β -Faltblättern und zwei α -Helices auf. Aufgrund ihrer molekularen Struktur lassen sich zwei Typen von C-Typ-Lektine unterscheiden, und zwar in Abhängigkeit von der Orientierung ihrer aminoterminalen Domäne. Typ-I-C-Typ-Lektine haben eine aminoterminal extrazelluläre Domäne, die mehrere CRDs aufweist. Im Gegensatz dazu weisen Typ-II-C-Typ-Lektine eine einzige CRD im carboxyterminalen Bereich auf. Typ-II-C-Typ-Lektine sind Typ-II-Transmembranproteine mit einem aminoterminalen cytoplasmatischen Bereich. Als Prototyp für Typ-I-C-Typ-Lektine gilt der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR; CD206). Der MMR besitzt acht CRDs und weist eine Cystein-reiche aminoterminal Domäne mit großer Ähnlichkeit zu Fibronectin II auf, die für den Transport von Antigen eine Rolle spielt [Taylor et al. 1990]. Daneben zählt DEC205 (CD205) als DC-spezifischer Multilektinrezeptor zu den Typ-I-C-Typ-Lektinen. Cytoplasmatisch weist DEC205 Sequenzen auf, die mit Internalisierung und intrazellulärer Lokalisierung in Verbindung gebracht werden [Mahnke et al. 2000]. Sowohl der MMR als auch DEC205 besitzen Tyrosin-Motive, die eine Internalisierung mittels Clathrin-vermittelter-Endozytose (engl. „clathrin-mediated-endocytosis“, – CME –) vermitteln [Bonifacino und Dell'Angelica 1999]. Die Gruppe der Typ-II-C-Typ-Lektine wächst stetig an. Viele Typ-II-C-Typ-Lektine weisen spezifische Ausprägungsmuster auf unterschiedlichen DC-Populationen auf. Diese beinhalten den DCIR (engl. „DC immunoreceptor“) [Bates et al. 1999], die DC-assoziierten C-Typ-Lektine Dectin-1 und Dectin-2 [Ariizumi et al. 2000a, Ariizumi et al. 2000b] und den C-Typ-Lektin-Rezeptor 1 (CLEC-1) [Colonna et al. 2000]. Die natürlichen Liganden vieler C-Typ-Lektine sind derzeit weiterhin unbekannt. Dectin-1 jedoch wurde kürzlich als Rezeptor für Zymosan, eine β -Glukan-reiche Komponente der Zellwand von Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), identifiziert [Brown et al. 2003].

Während die Signalvermittlung im Falle von TLRs relativ weit untersucht wurde, ist über Signalvermittlung von C-Typ-Lektinen wenig bekannt. Einige C-Typ-Lektine weisen in ihren cytoplasmatischen Domänen ITAMs (engl. „immunoreceptor-tyrosine-based-activating-motif“) auf, beispielsweise Dectin-1, andere besitzen ITIMs (engl. „immunoreceptor-tyrosine-based-inhibitory-motif“), z.B. DCIR (CLEC4A). Andere C-Typ-Lektine tragen im cytoplasmatisch proximalen Bereich der Transmembrandomäne einen Lysin- oder Arginin-Rest, der eine Interaktion mit ITAM-tragendem Signaladapter ermöglicht. So interagierten DCAR und Dectin-2 mit der FcR- γ -Kette. Zu der Gruppe der Signaladapter, die mit C-Typ-Lektinen interagieren können, gehören DAP (engl. „DNAX activation protein“)¹⁰, DAP12, FcR- γ -Kette und CD3 ζ . Die Beschreibung der Signaltransduktionsereignisse nach Bindung von C-Typ-Lektinen meist mit monoklonalem Antikörper (mAk) ist uneinheitlich und reicht von Aktivierung von Syk (engl. „spleen tyrosine kinase“)-Familie-Kinasen und Calcium-Oszillation bis zur Aktivierung von SHP-1 und SHP-2 Phosphatasen.

1.5 CD303 – „Blood Dendritic Cell Antigen 2“ –

CD303 (BDCA-2) ist ein Typ-II-C-Typ-Lektin, das spezifisch von humanen PDC ausgeprägt wird. CD303 hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 25 kDa, verhält sich im SDS-PAGE jedoch wie ein 38 kDa Molekül. Seine Sequenz umfasst 213 Aminosäuren (AS) mit drei potentiellen Amino-Glykosylierungsstellen. Die 21 AS lange cytoplasmatische Domäne von CD303 weist kein derzeit bekanntes Signaltransduktionsmotiv auf. Proximal zur Transmembrandomäne befindet sich ein Lysinrest (K20), eine potentielle Interaktionsstelle mit einem Signaladapter wie DAP12 oder FcR- γ -Kette. Fünf Transkriptvarianten von CD303 wurden bisher identifiziert [Dzionek et al. 2001]: eine ca. 750 Basenpaar langes Transkript voller Länge sowie vier kürzere Transkripte, die vermutlich auf alternatives Spleißen der mRNA zurückzuführen sind [Dzionek et al. 2001]. Diesen Transkriptvarianten fehlten entweder Exon 3, Exon 4, Exon 3 und 4 oder Exon 3 und 5. Nach Translation würden dabei CD303 Varianten entstehen, die keine Transmembrandomäne, keine „Neck“-

Domäne oder CRD aufweisen oder Kombinationen daraus. Keine dieser Varianten wurde bisher untersucht.

Die höchste Homologie auf Basis der gesamten AS-Sequenz teilt CD303 mit murinem Dectin-2 (50,7%), während die CRD von CD303 mit 60% zu der CRD von humanen DCIR (CLEC4A) homolog ist. Die einzelne CRD von CD303 weist an Position AS 172-174 ein Glutamat-Prolin-Aparagin-(EPN)-Motiv auf, das mit einer Mannose-Spezifität in Verbindung gebracht wird [Weis et al. 1998]. Der natürliche Ligand von CD303 ist derzeit unbekannt. Dzionek et al. [Dzionek et al. 2001] konnten zeigen, dass die Ligation von anti-CD303-mAk an CD303 zu einem schnellen, transienten Calcium-Influx führt, an dem Kinasen der src-Familie beteiligt zu sein scheinen, da die Calcium-Oszillation mit einem src-Kinase-spezifischen Inhibitor (PP2) beeinträchtigt werden kann. Die Calcium-Ionen stammen dabei aus intrazellulären Kompartimenten. Darüber hinaus führt die Ligation von mAk an CD303 zu einer Protein-Tyrosin-Phosphorylierung. Diese Signaltransduktionsereignisse gehen einher mit der schnellen Internalisierung von CD303 und anti-CD303-mAk-Komplex, welches in das späte endosomale/lysosomale Kompartiment überführt zu werden scheint, da hier die Beladung von MHC-II-Molekülen erfolgt, die Peptide des anti-CD303-mAk präsentieren, wie in einer MLR (engl. „mixed lymphocyte reaction“) mit isotypspezifischen CD4-T-Zellen gezeigt werden konnte. Dies korreliert mit der Präsenz einer sauren Triade (EEE) innerhalb der aminoterminalen cytoplasmatischen Domäne von CD303. Im Falle von DEC205 konnte gezeigt werden, dass für die Überführung dieses Lektins in das lysosomale Kompartiment eine saure Triade verantwortlich ist [Mahnke et al. 2000].

Funktionell ist die bemerkenswerteste Eigenschaft von CD303 die Inhibition der IFN-I-Produktion von stimulierten PDC, die nach Ligation von CD303 mit anti-CD303-mAk spezifisch hervorgerufen wird.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Vordergrund dieser Arbeit steht die funktionelle Charakterisierung des rezeptorvermittelten Signaltransduktionsweges des für humane plasmacytoide dendritische Zellen spezifischen Typ-II-C-Typ-Lektins CD303 (BDCA-2). Da die CD303-Ligation mit monoklonalem Antikörper in der Inhibition von Typ-I-Interferonen mündet, sollte hier der zugrunde liegende Mechanismus näher charakterisiert werden. Dabei diene die bereits identifizierte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung in PDC, die nach CD303-Ligation mit anti-CD303-mAk in PDC induziert werden kann, als Ausgangspunkt [Dzionek et al. 2001]. Zudem sollte mittels Microarray-Analyse eine mögliche Genregulation nach CD303-Ligation erfasst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung von HEK-293T-Zellen

HEK-293T-Zellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro ml in „Dulbeccos modified Eagles“-Medium (DMEM, Invitrogen), das mit 10% fetalem Kälber-Serum (FCS, PAA Linz), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies) supplementiert worden war, bei 37°C und einer wassergesättigten Atmosphäre mit 7% CO₂-Gehalt inkubiert. Die Zellen wurden im konfluenten Stadium mit sterilem PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH7,2) mit 2 mM EDTA von der Plastikoberfläche der Zellkulturflaschen gelöst und entsprechend verdünnt.

2.2 Kultivierung von Jurkat-Zellen und PDC

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro ml in „Roswell Park Memorial Institute 1640“-Medium (RPMI-Medium, Miltenyi Biotec), das mit 10% fetalem Kälber-Serum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1 µM β-Mercaptoethanol (Life Technologies) supplementiert worden war, bei 37°C und 7% CO₂-Gehalt inkubiert. Für PDC wurde das RPMI-Medium zusätzlich mit 10 ng/ml rekombinanten Interleukin-3 (Biosource) versetzt, das für das Überleben der Zellen essentiell ist. Die IFN-I Produktion von PDC wurde durch Zugabe des TLR-9-Liganden ODN2216 (5'-GGGGGACGATCGTCGGGGGG-3') (Metabion, Martinsried) induziert [Krug et al. 2001].

2.3 Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrische Analyse von Zellen wurde mit einem FACScan (488 nm Argon-Laser, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Diese Methode erlaubt die Messung einzelner Parameter einer einzelnen Zelle anhand von emittierter Fluoreszenzstrahlung. Die Zellen werden durch einen Flüssigkeitsstrom in eine Meßküvette überführt und durchlaufen dort einzeln einen fokussierten Lichtstrahl. Die resultierende Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich von 0-10° zum einfallenden Licht bezeichnet man als Vorwärtsstreulicht (FSC), während die Lichtstreuung im rechten Winkel (90°) Seitwärtsstreulicht (SSC) genannt wird. Das FSC korreliert dabei mit der Zellgröße und das SSC mit der Granularität und Membranfaltung einer Zelle. Als weitere Parameter lassen sich emittierte Fluoreszenzstrahlungen in verschiedenen Wellenlängen detektieren [Radbruch 1992]. Die Fluorophore wurden mit einer Anregungswellenlänge von ca. 488 nm gewählt, und die Emissionswellenlängen wurden folgenden Filtern zugeordnet:

FL-1 (530±30 nm) – Fluoreszein, FITC

FL-2 (585±42 nm) – R-Phycoerythrin, PE

FL-3 (>670 nm) – Propidiumiodid

Die FSC und SSC wurden mit linearer, die Fluoreszenzsignale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. In der Regel wurden 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen aufgenommen mit einer Durchflussrate kleiner 1000 Zellen pro Sekunde. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der „CellQuest Research Software 3.1“ (Becton Dickinson).

Für Immunfluoreszenzfärbungen von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen in einer PBS-Lösung mit 2% Formaldehyd (Merck, Darmstadt) 10 Minuten bei RT fixiert, mit PBS-BSA-Puffer zweimal gewaschen und in PBS-Puffer mit 0,2% Saponin für 30 Minuten inkubiert [Bangham und Horne 1962]. Die Färbung der Zellen erfolgte dann mit den entsprechenden Ak-Konjugaten für weitere 20 Minuten. Nach zwei Waschschritten in PBS-Saponin-Puffer wurden die Zellen in PBS-EDTA-Puffer für die FACS-Analyse oder konfokale Laser-Scanner-Mikroskopie überführt.

Die durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Calcium-Konzentrationen von Indo-1 vorbehandelten PDC erfolgte anhand des Verhältnisses der bei 405 nm und 510 nm ermittelten Emissionsintensitäten, die am Institut für Genetik (Universität zu Köln, Köln) mittels eines FACSVantage erfasst wurden.

2.4 Aufreinigung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Die Aufreinigung von peripheren mononukleären Zellen (engl. „peripheral blood mononuclear cells“, -PBMCs-) aus Spenderblut erfolgte aus für Leukozyten angereicherten Buffycoats durch Dichtegradientenzentrifugation. Buffycoats wurden am Institut für Transfusionsmedizin (Uniklinikum, Dortmund) erworben und enthalten in ca. 60 ml Blut etwa $0,5$ bis 1×10^9 PBMCs.

Das Blut eines Buffycoats wurde auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und bei 20°C mit $400 \times g$ für 35 Minuten zentrifugiert. Am Ende des Zentrifugationsschrittes war darauf zu achten, dass der Rotor ohne Bremse ausschwingt, um ein Vermischen der sich gebildeten Phasen zu verhindern. Die Leukozytenfraktion wurde vorsichtig, mit möglichst wenigen Erythrozyten, abgenommen, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt und mit PBS/EDTA auf 35 ml aufgefüllt. Die Suspension wurde auf 15 ml Ficoll-Paque™ (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgeschichtet, ohne dass es zu einer Vermischung kam. Durch eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation ($s = 1,077$) bei 20°C mit $400 \times g$ für 35 Minuten, ohne Bremse, trennten sich Erythro- und Granulozyten von den mononukleären Zellen. Diese bildeten eine Interphase auf dem Ficoll-Paque™, die abgenommen und mit dem 10-fachen Volumen PBS/EDTA gewaschen wurde. Dabei erfolgte eine Zentrifugation der Zellen am Ende des Waschschrilles bei $300 \times g$ für 15 Minuten bei 20°C . Durch einen zweiten Waschschrill bei $200 \times g$ für 10 Minuten wurde mit dem Überstand ein Großteil noch vorhandener Thrombozyten verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS/EDTA resuspendiert, im Anschluss konnte mit einem Aliquot die Zellzahl bestimmt werden.

2.5 Aufreinigung von Leukozyten aus Leukapherese-Produkten

Leukozyten aus Leukapherese-Produkten, die von der DRK-Blutspendezentrale Ulm stammten, wurden angereichert, indem die Leukapherese-Produkte für 10

Minuten bei Raumtemperatur einem hyperosmolaren Ammoniumchlorid-Puffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA) ausgesetzt wurden. Dadurch werden Erythrozyten und teilweise Granulozyten lysiert. Die verbleibenden Leukozyten wurden mit PBS/EDTA gewaschen sowie für 10 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert, um Thrombozyten abzureichern.

2.6 Magnetische Zellsortierung – MACS –

Die magnetische Zellseparation ermöglicht die spezifische Anreicherung von Zellpopulationen aus einem Zellgemisch. Dabei werden die Zellen zunächst spezifisch mittels monoklonaler Antikörper direkt oder indirekt mittels Sekundärreagenz mit superparamagnetischen Partikeln markiert. Die Zellsuspension wird auf eine Trennsäule mit einer Stahlkugelmatrix aufgetragen, die sich im Hochgradienten-Magnetfeld eines Permanentmagneten befindet. Markierte Zellen werden auf der Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen das Magnetfeld ungehindert passieren. Die MACS-Technologie ermöglicht es, Zellen anzureichern oder sie zu depletieren [Miltenyi et al. 1990].

Die hier beschriebene Anreicherung von PDC erfolgte nach den Vorgaben des BDCA-4 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Die Isolation von PDC aus PBMC erfolgte über an Magnetpartikel gekoppelte anti-BDCA-4 Antikörper. Um eine unspezifische Fc-Rezeptor vermittelte Anreicherung auszuschließen, wurden die Rezeptoren CD16, CD32, CD64 vorab durch Zugabe von humanem Immunglobulin (FcR-Blockierungsreagenz) abgesättigt.

Protokoll für 1×10^8 Zellen:

Isolierte PBMCs wurden in 300 μl PBS/EDTA/BSA resuspendiert. Der Zellsuspension wurde 100 μl FcR-Blocking Reagenz, gefolgt von 100 μl anti-BDCA-4-MicroBeads zugesetzt, gemischt und bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen in dem 10- bis 20-fachem Volumen PBS/EDTA/BSA entfernt. Nach der Zentrifugation bei $300 \times g$ für 10 Minuten wurde das Zellpellet in 500 μl PBS/EDTA/BSA Zellen resuspendiert

und auf eine mit 3 ml PBS/EDTA/BSA äquilibrierte LS-Säule, die sich im Magnetfeld eines Permanentmagneten befand, aufgetragen. Nach Einlauf der Suspension in die Säule wurde diese dreimal mit je 3 ml PBS/EDTA/BSA-Puffer gewaschen, um anschließend nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld die angereicherten Zellen in 5 ml PBS/EDTA/BSA-Puffer zu eluieren.

Zur Verbesserung der spezifischen Anreicherungsquote der PDC wurde das Eluat auf eine mit 0,5 ml äquilibrierte MS-Säule aufgetragen und mit je 0,5 ml PBS/EDTA/BSA gewaschen. Eluiert wurden PDC in 1 ml PBS/EDTA/BSA-Puffer.

PDC aus Leukapheresaten wurden isoliert mittels CliniMACS® und CD304 CliniMACS®-Reagenz (Miltenyi Biotec). Die magnetische Zellseparation erfolgte dabei nach Herstellerangabe. Zur Bestimmung des Anreicherungsfaktors sowie der Reinheit der isolierten PDC wurde danach ein Aliquot der Zellen mit anti-CD303-Konjugat gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Bei PDC aus Leukapheresaten wurden zusätzlich die Zellen mit CD123-PE- und CD45-FITC-Konjugaten gefärbt.

2.7 Immunopräzipitation

5×10^6 Zellen wurden in 1 ml Lysispuffer (500 mM Tris-HCl pH7,4, 2% Triton X-100 (w/v), 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) für 30 Minuten auf Eis lysiert und nach Zusatz von Protein-G-Sepharose (Amersham Pharmacia) für 4 Stunden bei 4°C rotierend belassen, um unspezifisch an Protein-G-Sepharose haftende Proteine abzureichern („preclear“, engl.). Nach Zentrifugation mit $10^4 \times g$ für 10 Minuten bei 4°C konnte der Überstand von Protein-G-Sepharose und Zelldebris getrennt und für die Immunopräzipitation eingesetzt werden.

Für die Immunopräzipitation von CD303 wurde den Lysaten aus HEK-293T-HA-FcR- γ -Kette-CD303-Transmembrandomäne-Chimären 5 μ g/ml anti-CD303 (Klon AC144, Miltenyi Biotec) zugegeben und für eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Die Immunopräzipitation der schweren Clathrin-Kette (CHC) aus PDC-Lysaten erfolgte analog mit 4 μ g/ml anti-CHC-mAk (Klon X22,

Calbiochem, Darmstadt). Die mit mAk versetzten Lysate wurden nach der Inkubation mit 50 µl Protein-G-Sepharose versetzt und für 2 Stunden inkubiert. Die Immunopräzipitation erfolgte durch Zentrifugation mit $10^4 \times g$. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Immunopräzipitate in Laemmli-SDS-Probenpuffer (63 mM Tris-HCl, (pH6,8), 10% Glycerol, 2% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), 0,025% Bromphenolblau) überführt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

2.8 ELISA

Die Proteinkonzentrationen von IFN-alpha, CXCL11 (ITAC) und CCL5 (RANTES) in den inkubierten PDC-Medienüberständen wurden mit spezifischen „Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay“ (ELISA, engl.) nach den jeweiligen Herstellerangaben ermittelt. Der ELISA verbindet die spezifische Bindungseigenschaft von Ak und Ag mit der katalytischen Funktion eines Enzyms, so dass kleinste Mengen eines Proteins durch enzymatischen Umsatz eines Substrates anhand eines Standards bestimmt werden können. Als Substrat fungierte Tetramethylbenzidin (Pierce), zum Reaktionsabbruch wurde 10%ige H₂SO₄ verwendet und die Extinktion bei 450 nm mittels eines ELISA-Platten Photometers (MWG-Biotech, High Point, USA) ermittelt. Das „ITAC-ELISA-Kit“ und das „RANTES-ELISA-Kit“ wurden von R&D Systems (London, UK) bezogen. Das „IFN- α Module Set BMS216MST“ wurde von BenderMedSystems (Wien, Österreich) erworben.

2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen von Zelllysaten für 2D-Gelelektrophorese und SDS-PAGE wurden mit dem „2D-Quant-Kit“ (Amersham Pharmacia) oder nach Bradford et al. ermittelt [Bradford 1976].

2.10 SDS-PAGE

Die Größenauftrennung von Proteingemischen erfolgte mit Hilfe der Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Proben wurden hierfür in Laemmli-SDS-Probenpuffer (63 mM Tris-HCl, (pH6,8), 10% Glycerol, 2% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), 0,025% Bromphenolblau) überführt, sonifiziert und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Es wurden 10-20%-ige Tris-Glycin-SDS-Gele (Invitrogen, Heidelberg) verwendet. Die Lysate wurden in SDS-Laufkammern bei 125 V, 100 mA für eine Stunde größenfraktioniert. Als Größenstandard kam der PageRuler (MBI Fermentas) zum Einsatz. Teilweise wurden die Gele nach der Größentraktionierung mit Coomassie R250 (Amersham Pharmacia) gefärbt.

2.11 Immunoblot-Analyse

SDS-PAGE größenfraktionierte Proteine wurden mit Hilfe der „semi-dry“-Methode auf PVDF-Membranen (Amersham Pharmacia) transferiert. Der Transfer der Proteine erfolgte über eine Stunde bei 150 mA in einer BioRad-Kammer. Als Transferpuffer wurde eine 50 mM Tris-HCl Lösung pH7,2 mit 40 mM Glycin, 1,5 mM SDS und 20% Methanol verwendet.

Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte mit einer 5%igen BSA-Lösung in TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7,6) für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) oder 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Membranen mit Primärantikörper oder Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugate für 2 Stunden bei RT oder 4°C über Nacht inkubiert. Bei Primärantikörpern wurden die Membranen zweimal jeweils 5 Minuten bei RT mit TBS/0,1%-Tween-20-Puffer gewaschen und danach mit einem anti-Isotyp-Immunglobulin-Meerrettichperoxidase-Konjugat für 2 Stunden RT inkubiert. Membranen wurden vor der Detektion mittels ECL-Reagenz (Amersham Pharmacia) dreimal für jeweils 5 Minuten bei RT mit TBS/0,1%-Tween-20-Puffer gewaschen.

Folgende Antikörper und Antikörper-Konjugate wurden verwendet:

Antikörper	bezogen von
anti-Phospho-Tyrosin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Klon PY20)	BD
anti- PLC γ 2	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-Y759-PLC γ 2	Cell Signaling Technology
anti-Syk	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-Y525/526-Syk	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-Y352-Syk	Cell Signaling Technology
anti-Blnk	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-Y96-Blnk	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-PKC-Antikörper-Sampler-Kit	Cell Signaling Technology
anti-I κ B α	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-S32-I κ B α	Cell Signaling Technology
anti-Maus-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat	Jackson ImmunoResearch
anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Konjugat	Cell Signaling Technology
anti-schwere-Clathrin-Kette Klon TD.1	Sigma
anti-schwere-Clathrin-Kette Klon X22	Calbiochem
anti-FcR γ -Kette	Upstate

2.12 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse erfolgte unter Verwendung von HG-U133A-Microarrays (Affymetrix) am Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ, Berlin) durch Dr. J.R. Grün und Dr. A. Grützkau. Die HG-U133A-Oligonukleotidmicroarrays repräsentieren 18.000 humane Transkripte und mehr als 14.000 humane Gene. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Sonden sind komplementär zu den Sequenzen aus dem 3'-Bereich der entsprechenden Transkript-Sequenzen, um Signalartefakte, die aus Degradierung von RNA resultieren, zu vermindern. Der 3'-Bereich eines Gens wird dabei von sogenannten „perfect match (PM)“ bzw. „mismatch-(MM)“-Oligonukleotiden, die aus 11-20 Basenpaar-(bp)-langen Sonden bestehen, abgedeckt. Die PM-Sonden decken eine Gensequenz von ca. 500 bp Länge ab. Die MM-Sonden weisen dabei eine zentral liegende

Punktmutation innerhalb der sonst zur PM-Sonde identischen Nukleotidsequenz auf, wodurch unspezifische Hybridisierungen detektiert werden können. Die Auswertung der cRNA-Hybridisierungen erfolgte mittels „Microarray-Suite (MAS) 5.0“-Software (Affymetrix). Der MAS-Algorithmus bewertet dabei statistisch anhand der Signalintensitäten für PM und MM-Sonde, ob eine spezifische Hybridisierung stattgefunden hat. Die Spezifität der Hybridisierung erhält dabei einen „Discrimination Score (R)“, der die Signalintensitäten der PM- und MM-Sonden miteinander nach $R = (PM-MM)/(PM+MM)$ bewertet und gleichzeitig ein Maß für die Hybridisierungseffizienz ist. Zudem vergibt der MAS-Algorithmus eine statistische Bewertung, anhand der ein Transkript als präsent, marginal präsent oder als fehlend eingestuft wird („present, marginal present, absent detection call“, engl.).

Die Analyse wurde nach der „High Performance Chip Data Analysis (HPCDA)“ (A. Gruetzkau et al., eingereicht bei Arthritis and Rheumatism) durchgeführt. Dabei werden die MAS 5.0 generierten Daten der Microarrayanalyse in einer Datenbank nach Filterkriterien wie Signalschwelle (engl. „signal-threshold“), „detection call“ („present / marginal present / absent“, engl.) sowie der statistischen Aussage einer Genregulation, wobei ein Gen unverändert („no change“), erhöht („increase / marginal increase“) oder erniedrigt („decrease / marginal decrease“) reguliert sein kann, bewertet. Zusätzlich wurde die Genregulation, die als Verhältnis zwischen den betrachteten Proben als Logarithmus zur Basis 2 (\log_2) die Zunahmen der Transkriptmenge als $\log_2 > 1$ und die Abnahme der Transkriptmenge als $\log_2 < -1$ darstellt, als Filterkriterium in die Analyse einbezogen. Dadurch ließ sich die Signifikanz der Genregulationskandidaten steigern.

Für die Microarray-Analyse wurden CD304-angereicherte PDC von insgesamt 10 Spendern verwendet, um spenderspezifische Genregulationsmuster zu minimieren. Die RNA aus PDC wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert und mit DNase (RNase-free-DNase-Set, Qiagen) behandelt, um genomische DNA Kontamination zu beseitigen. Die Gesamt-RNA wurde mittels RiboGreen-RNA-Quantitation-Kit (Molecular Probes) bestimmt und aus jeweils 15 µg RNA doppelsträngige cDNA generiert unter Verwendung der

Superscript-II RNase-H⁻ Reversen-Transkriptase (Superscript-II-Kit, Invitrogen). Aus dieser doppelstängige cDNA wurde anschließend biotinylierte cRNA mit Hilfe des „BioArray High Yield Transcription Labeling Kit“ (Enzo Diagnostic) generiert. Fragmentierung, Hybridisierung, Waschen, Färbung und Detektion der HG-U133A-Oligonukleotidarrays wurden nach „Affymetrix Gene Expression Analysis Technical Manual“ (Affymetrix) durchgeführt.

2.13 mRNA-Präparation

Das Prinzip des verwendeten „µMACS-mRNA-Isolation-Kit“ (Miltenyi Biotec) beruht auf zwei Eigenschaften eukaryotischer mRNA: zum einen auf den Hybridisierungseigenschaften von komplementären Nukleinsäuresequenzen und zum anderen auf der posttranskriptionellen Polyadenylierung der meisten eukaryotischen mRNA-Transkripte.

Dabei werden einem Zellysat aus Thymidinen bestehende Oligonukleotide [d(T)₂₅], die kovalent an superparamagnetische Partikel gebunden sind, zugesetzt. Die am 3'-Ende der mRNA befindliche Polyadenylierung hybridisiert mit der komplementären Thymidin-Sequenz und kann so auf der Stahlkugelmatrix einer sich im Magnetfeld befindlichen µMACS-Säule zurückgehalten werden. Kontaminierende DNA und Proteine können anschließend mittels SDS-haltigem-Lysepuffer und Niedrigsalzpuffer entfernt werden. Die Elution erfolgt mit 65°C warmen RNase-freiem Wasser ohne Entnahme der µMACS-Säule aus dem Magnetfeld. Das Poly(A)-RNA/Oligo-(dT)-Hybrid wird dabei aufgrund der Temperatur getrennt (Schmelzen). Eluierte mRNA wurde bei -70°C gelagert.

2.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der direkten Amplifikation von DNA-Sequenzen. Sie besteht aus mehreren Zyklen, in denen die DNA-Matrize denaturiert, die Oligonukleotide mit den komplementären Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Bereichs

hybridisieren und die DNA-abhängige DNA-Polymerase das Segment ausgehend vom 3'-OH-Ende des Oligonukleotides polymerisiert. Die Amplifikation hat zu Anfang exponentiellen Charakter. Diese Methode basiert auf thermostabilen DNA-Polymerasen, die trotz Denaturierung ihre Aktivität beibehalten.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt 100 ng DNA, je 10 pmol eines 5'- und eines 3'-Oligodesoxynukleotides (Primer), 0,2 mM dNTP-Mix, MgCl₂-haltigen PCR-Puffer und 1 U Taq-DNA-Polymerase (NEB). Der Ansatz wurde in einem MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) auf 95°C für 2 Minuten erhitzt und anschließend folgendes Programm mit 30 Zyklen gestartet:

Denaturierung	15 Sekunden 95°C
Primer-Anlagerung	20 Sekunden 55-65°C (je nach Primer)
DNA-Elongation	60 Sekunden 72°C (ca. 1 Minute/1200 Nukleotide)

Nach dem letzten Zyklus wurde der Reaktionsansatz für 5 Minuten bei 72°C inkubiert.

2.15 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Die Elektrophorese nutzt das Laufverhalten geladener Moleküle im elektrischen Feld, um diese entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. DNA wandert aufgrund der Phosphatreste als negativ geladenes Molekül zur Anode. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente werden 0,8%- bis 1,5%-ige Agarosegele verwendet. Durch Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffes Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, können die Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.16 DNase Verdau

Desoxyribonuclease I (Fermentas, St. Leon-Rot) ist eine Endonuklease, die als Substrat einzel- und doppelsträngige DNA erkennt. Als Abbauprodukte entstehen vornehmlich Tetranukleotide mit 5'-Phosphatenden. Desoxyribonucleasen werden eingesetzt, um DNA-Kontaminationen in RNA-Präparationen zu eliminieren, falls die DNA einen störenden Einfluss für nachfolgende Untersuchungen darstellt.

2.17 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen [Sambrook et al. 1989]

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Entsprechend des Lambert-Beer'schen Gesetzes verhält sich die Absorption der UV-Strahlung proportional zur Konzentration der Nukleinsäure. Da Proteine neben ihrem Absorptionsmaximum bei 280 nm ein weiteres bei 260 nm aufweisen, wurde die optische Dichte (OD) bei 280 nm zusätzlich bestimmt. Durch Quotientenbildung OD_{260nm}/OD_{280nm} wurde der Kontaminationsgrad der Nukleinsäure mit Proteinen abgeschätzt. Werte zwischen 1,8 und 2,0 deuteten auf reine DNA/RNA hin. Für die Nukleinsäurekonzentrationen gelten folgende Näherungswerte:

einzelsträngige DNA/RNA	1 OD _{260 nm} \approx 40 µg/ml
doppelsträngige DNA	1 OD _{260 nm} \approx 50 µg/ml

2.18 Reverse Transkription

Der Prozess, bei dem ausgehend von einer RNA-Matrize eine RNA-abhängige DNA-Polymerase eine komplementäre DNA (cDNA) generiert, wird als Reverse Transkription bezeichnet. Bei der hier verwendeten Expand Reverse Transkriptase (Roche, Mannheim) handelt es sich um eine genetisch modifizierte Variante des „Moloney Murine Leukämie Virus [Mo-MuLV] Reverse Transkriptase (RT)“. Die Mo-MuLV-RT weist zwei funktionell unabhängige Domänen auf: die N-terminale-Domäne mit DNA-Polymerase-Aktivität und die

C-terminale mit RNase-H-Funktion. Die DNA-Polymerase ist im nativen Zustand des Enzyms anfällig für Sekundärstrukturen der RNA, die zum Abbruch der Erststrang-Synthese führen können. Darüber hinaus führt die RNase-H-Aktivität häufig zur Hydrolyse der RNA im Bereich der cDNA-Elongation, wodurch es zur Denaturierung des DNA/RNA-Hybrids kommen kann [Sambrook et al. 1989].

2.19 Semi-quantitative Reverse Transkription-(RT)-PCR

Der LightCycler vereinigt die Funktion eines Blockcyclers und einer Fluoreszenzdetektionseinheit in einem Gerät. Durch Zusatz eines Fluoreszenzfarbstoffes kann die Amplifikationsrate eines DNA-Fragmentes in einer PCR verfolgt und durch Vergleich mit einem Standard die Ausgangsmenge der Matrize bestimmt werden. Man spricht dabei von Quantitativer PCR. Das LightCycler-System arbeitet mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green-I, der in doppelsträngige DNA interkaliert und durch die Interkalation nach Anregung eine 100-fach intensivere Fluoreszenzstrahlung emittieren kann.

Als RT-PCR bezeichnet man die kombinierte cDNA-Synthese mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase und der Amplifikation eines DNA-Fragmentes durch PCR, wobei beide Reaktionen in einem Gefäß hintereinander ablaufen.

Die Kinetik einer RT-PCR lässt sich in vier Phasen untergliedern. Zuerst wird die RNA in eine cDNA-Matrize linear umgeschrieben. Die drei folgenden Bereiche der darauf erfolgenden PCR sind eine Verzögerungsphase, gefolgt von einer exponentiellen Phase, bevor die Reaktion in einen Plateaubereich übergeht. Das Fortschreiten der PCR lässt sich in jedem Zyklus der Reaktion durch die Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I in das entstehende doppelsträngige PCR-Produkt nachweisen. Mit der bei 530 nm detektierbaren Emissionsstrahlung von SYBR Green I lässt sich das PCR-Produkt anhand einer Standardkurve quantifizieren. Die Quantifizierung erfolgt während der exponentiellen Phase. Es wird der Zeitpunkt bestimmt, an dem das

Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen tritt; der sogenannte „Crossingpoint“ hat dabei eine Zykluseinheit. Mittels $T_n = T_0 \times (E)_n$ (T_n = Menge des Amplifikats im n-ten Lauf, T_0 = Ausgangsmenge der Zielsequenz vor der PCR, E = Effizienz der Amplifikation, n = Zyklus) kann anhand einer zuvor bestimmten Standardkurve für das Amplifikat die Ausgangsmenge bestimmt werden. Die Detektion der Fluoreszenzstrahlung erfolgte im Anschluss an die DNA-Synthese jedes Zyklus. Am Ende der PCR wurde nach kurzer Denaturierung die Temperatur auf 65°C eingestellt und durch schrittweise Temperaturerhöhung mit $dT = 0,05^\circ\text{C}$ pro Sekunde eine Schmelzkurve erstellt, mit deren Hilfe die Spezifität des amplifizierten Produktes überprüft werden konnte. Die Schmelztemperatur gibt dabei die Temperatur an, bei der das Fragment zu 50% doppel- beziehungsweise einzelsträngig vorliegt.

Für die Validierung der Microarray-Regulationsdaten wurden die Ausprägungsniveaus der mRNA von CCL5, CXCL11 und CLEC4A von CpG-stimulierten PDC-Proben verglichen, die 15 Stunden in Gegenwart von 10 µg/mL anti-CD303-mAk oder Isotypkontrolle (CK3-6H5, mIgG1) inkubiert worden waren. Die mRNA wurde isoliert mit dem µMACS™-mRNA-Isolation-Kit (Miltenyi Biotec). Nach einer DNase-I-Behandlung (Fermentas, St-Leon, Germany) und einer RNA-Aufreinigung (RNeasy Mini Kit, Qiagen) wurde eine semi-quantitative RT-PCR durchgeführt unter Verwendung des LightCycler-Systems und des LightCycler®-RNA-Amplification-Kit-SYBR-Green-I (Roche Diagnostics, Mannheim). Die PDC-Proben von drei Spendern wurden auf das Genprodukt der Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) normalisiert. Verwendet wurden für die RT-PCR folgende Oligonukleotide, die von Metabion bezogen wurden.

PPIA-for 5'-CAAATGCTGGACCCAACACA-3'

PPIA-rev 5'-TGCCATCCAACCACTCAGTC-3'

CCL5-for 5'-AAAGCCTAGAAGAGCTTCTG-3'

CCL5-rev 5'-GGAAGCTTAAGAGTGCAAGT-3'

CXCL11-for 5'-TGAAAGGTGGGTGAAAGGAC-3'

CXCL11-rev 5'-GCACTTTGTAACTCCGATGG-3'

CLEC4A-for 5'-GCCCAAAGAATTGGAAGTCA-3'

CLEC4A-rev 5'-GGATGCCAGAATGTGGAAGT-3'

2.20 Klonierungsstrategie

Für die Analyse einer möglichen Interaktion zwischen CD303 und dem ITAM-tragenden Signaladapter FcR- γ -Kette wurden sowohl eine HA-markierte FcR- γ -Kette sowie CD303-Transmembranchimera in HEK293T-Zellen transfiziert.

Klonierung der FcR- γ -Kette in pDisplay

Zu Beginn der Klonierung der FcR- γ -Kette in pDisplay (Invitrogen) wurde die FcR- γ -Kette mit 5'-CTA GAG ATC TGA GCC TCA GCT CTG CTA TAT-3' und 5'-TAA TGC GGC CGC ATC CGT AAA CAG CAT CTG AGC-3' Oligonukleotiden mittels PCR aus PDC cDNA (Superscript II, Invitrogen) amplifiziert. Dabei wurde eine Bgl II (a/gatct) Schnittstelle am 5'-Ende und eine Not I (gc/ggccgc) Schnittstelle am 3'-Ende der FcR- γ -Kette eingeführt. Nach Restriktion der FcR- γ -Kette mit den Endonukleasen Bgl II und Not I (New England Biolabs, NEB) wurde das Fragment in den linearisierten pDisplay-Vektor unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben kloniert. Dabei entstand ein Konstrukt, wodurch eine aminoterminal verkürzte und mit einem Hämagglutinin-A-Epitop (HA) versehene FcR- γ -Kette unter der Kontrolle eines CMV-Promotors rekombinant dargestellt werden konnte. Zudem weist pDisplay ein Neomycin-Gen auf, wodurch sich Transfektanten nach Gabe von Geneticin (G-418) (Gibco) selektionieren lassen.

Klonierung von CD303-Transmembrandomäne-Chimera

Bei der Klonierung von CD303 mit Austausch der Transmembrandomäne wurde ein bereits in der Arbeitsgruppe vorliegendes pRc/CMV2-CD303-Konstrukt verwendet. Die DNA-Sequenzen für den Austausch der CD303-Transmembrandomäne wurden als Auftragsarbeit generiert (Entelechon GmbH, Regensburg). Der Austausch erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme PflM I und PshA I (NEB). Da die pRc/CMV2-Konstrukte ein Neomycin-Resistenzgen aufweisen, wurden CD303, CD303-CLEC4A und CD303-CLEC4D in den pEF6/Myc-HIS Vektor kloniert unter Verwendung von BamH-I- und Not-I-

Endonukleasen (NEB), so dass stabile Transfektanten mittels Blasticidin (Invitrogen) selektioniert werden konnten. Eine DNA-Sequenzierung aller Konstrukte wurde bei AGOWA GmbH (Berlin) durchgeführt, die Sequenzen wurden mit „DNA-Strider“-Software überprüft.

2.21 Transfektion von HEK-293T-Zellen

Unter Verwendung des FuGene Reagent (Roche, Mannheim) wurden 1×10^6 HEK-293-T-Zellen mit 2 µg pDisplay-HA-FcR- γ -Kette nach Herstellerangaben transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit anti-HA-Biotin und anti-Biotin-Microbeads (Miltenyi Biotec) markiert, per MiniMacs und MS-Säulen (Miltenyi Biotec) isoliert und unter Verwendung von G418 stabile Transfektanten selektioniert. Jeweils 1×10^6 HEK-293-T-HA-FcR- γ -Transfektanten wurden mittels FuGene-Reagent mit 2 µg pEF/CD303-Wildtyp (wt), pEF/CD303-CLEC4D-TM und pEF/CD303-CLEC4A-TM transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit anti-CD303-Biotin und anti-Biotin-Microbeads (Miltenyi Biotec) markiert und per MiniMacs und MS-Säulen (Miltenyi Biotec) isoliert. Anschließend wurden unter Verwendung von G418 und Blasticidin stabile Transfektanten selektioniert. Die Nukleinsäuresequenzen der Konstrukte sind im Anhang (6.1) dargestellt.

2.22 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese ist eine Methode der diskreten Darstellung von Proteingemischen, wobei diese nach iso-elektrischem Punkt und Molekulagewicht aufgetrennt werden [Görg et al. 2000]. Der iso-elektrische Punkt eines Proteins ist der pH-Wert, bei dem sich positive und negative Partialladungen eines Proteins gegenseitig aufheben und die Nettoladung null entspricht. Da zusätzlich das Proteingemisch SDS-PAGE größenfraktioniert wird, kommt es zu einer diskreten Darstellung einzelner Proteinformen, die es erlaubt, Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierungen und

Polymorphismen darzustellen. Für die iso-elektrische Fokussierung werden immobilisierte pH-Gradienten-(IPG)-Gele verwendet.

Zellen wurden in 500 µl Lysis-Puffer (8 M Urea, 4% CHAPS, 2% IPG-Puffer, 60 mM DTT) aufgenommen und mittels Sample Grinding Kit (Amersham Pharmacia) lysiert. Proteinkonzentrationen wurden mit dem 2D Quant Kit (Amersham Pharmacia) bestimmt, und IPG-Gele mit jeweils 100 µg (ca. 2×10^7 PDC und 1×10^6 HEK-293-T-Transfektanten) (Amersham Pharmacia) durch Rehydratisierung mit den Lysaten beladen. Die iso-elektrische Fokussierung erfolgte mit einem Gradientenprogramm über insgesamt 8 kVolt-Stunden in einer Multiphor II Unit (Amersham Pharmacia) mit einer maximalen Spannung von 3500 Volt. Die IPG-Gele wurden danach in Äquilibrationpuffer (50 mM Tris-HCl (pH8,8), 6 M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, 0,0025% Bromphenolblau) mit 45 mM DTT für 15 Minuten reduziert und für weitere 15 Minuten mit 90 mM Iodoacetamid-haltigem Äquilibrationpuffer inkubiert. Die SDS-PAGE-Größenfraktionierung fand im Anschluß unter Verwendung der Hoefer-SE-260-Elektrophorese-Kammer (Amersham Pharmacia), NuPage 10-20% Bis-Tris-Gradienten-Gelen und NuPage Puffer-System (Invitrogen) statt.

2.23 Trypsin-Verdau im Gel

Coomassie-gefärbte Proteinbanden wurden aus dem SDS-Gel ausgestochen und in Acetonitril-Wasser (1:1) dreimal gewaschen. Nach Zusatz von purem Acetonitril wurden die jetzt eingeeingten Gelstücke in 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer aufgequollen und in einer Speedvac Zentrifuge getrocknet. Proteine wurden durch Zusatz von 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer bei 56°C für 45 Minuten reduziert und anschließend der überschüssige Reduktionspuffer abgenommen. Zur Alkylierung reduzierter Cystein-Reste wurden die Gelstücke in gleichem Volumen einer 50 mM Iodoacetamid-Lösung, gelöst in 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer, für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Gelstücke dreimal in 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer gewaschen. Die Gelstücke wurden erneut in einer 0°C kalten 10 mM NH_4HCO_3 -Lösung mit 12,5 ng/µL Trypsin (Promega) aufgequollen und für 45 Minuten auf Eis inkubiert.

Überschüssige Trypsin-Lösung wurde mit 5-20 µL 10 mM NH_4HCO_3 -Puffer ohne Trypsin abgenommen und der Trypsinverdau bei 37°C über Nacht durchgeführt. Der Trypsinverdau wurde durch Zusatz von 5-20 µL 1% Trifluorsäure gestoppt, dann wurden die Peptide 30 Minuten bei 37°C extrahiert.

2.24 MALDI-TOF – Massenspektrometrie von Peptiden

1,0 µL der extrahierten Peptide wurden mit 1,2 µL einer 2,5 mg/mL 2,5-Dihydroxybenzolsäure in 0,1 % TFA-Acetonitril (2:1) vermischt und auf eine 800-µm-anchor-target (Bruker Daltonics, Bremen) gespottet. Das positive Ionenspektrum wurde mit einem Reflex-IV-MALDI-TOF-Massen-Spektrometer (Bruker Daltonics) im Reflectron-Modus generiert. Ein Peptidkalibrierungsstandard (Bruker Daltonics) wurde für die externe Kalibrierung des Massenbereiches von 1046 m/z bis 3147 m/z verwendet. Für die Rekalibrierung eines Trypsinautolyseprofiles sowie der Analyse der generierten Massenspektrometrischen Profile der Proben wurde die FlexAnalysis Software eingesetzt. Proteine wurden unter Verwendung des MASCOT 1.9 Algorithmus (Matrix Science, London, UK) und der NCBI-Database (National Center for Biotechnology Information) identifiziert. Dazu erfolgten Datenbankabfragen unter Verwendung von Proteinscape 1.3 und Biotools 3.0 (Bruker Daltonics) mit folgenden Parametereinstellungen: enzyme: „trypsin“, species: „human“, fixed modifications: „carbamidomethyl“, optional modifications: „methionine oxidation“, missed cleavages: „1“, mass tolerance: „150 ppm“ (Peptidkalibrierungsstandard als externe Kalibrierung), mass tolerance: „60 ppm“ (Trypsinautolyseprofil als interne Kalibrierung)

3 Ergebnisse

PDC gelten als die Hauptproduzenten von IFN-I. Die IFN-I Produktion kann in PDC durch mikrobiellen oder viralen Stimulus induziert werden. Die Ligation von CD303 mit mAk in stimulierten PDC führt zur Inhibition der IFN-I Produktion. Da die IFN-I Inhibition erst Stunden nach Stimulation der Zellen und nach Ligation von mAk an der C-Typ-Lektin-Struktur detektiert werden kann, stellte sich die Frage, welcher Mechanismus der IFN-I Inhibition zugrunde liegt. Deshalb sollten die Effekte der mAk-Ligation an CD303 mittels Microarray-Analyse untersucht werden. Außerdem erfolgte eine Aufschlüsselung der durch CD303-Ligation vermittelten Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen.

3.1 Microarray-Analyse

Zur Charakterisierung der durch CD303-Ligation hervorgerufenen Genregulation in PDC wurde eine Microarray Analyse durchgeführt. Dazu wurden Affymetrix HG-U133A Microarrays und PDC, die aus zehn Spendern vereinigt wurden, verwendet. Vier experimentelle Ansätze wurden verglichen: PDC stimuliert mit CpG-Oligonukleotiden mit anti-CD303-Antikörper oder anti-Cytokeratin-Antikörper als Isotypenkontrolle behandelt, sowie unstimulierte PDC mit anti-CD303 Antikörper oder anti-Cytokeratin Antikörper behandelt. Die Zellen wurden nach 15 Stunden geerntet. Die Affymetrix HG-U133A-Microarray-Serie verwenden 22283 sogenannte „Probesets“. Diese entsprechen mehr als 18.000 humanen Transkripten und etwa 14.000 humanen Genen. Mit Hilfe des MAS-5.0-Algorithmus wurden ca. 50% der „Probesets“ als präsent eingestuft (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnisübersicht der Affymetrix-HG-U133A-Microarrayanalyse.

Tabellarische Zusammenfassung der Affymetrix-HG-U133A-Microarrayanalyse CpG-stimulierter und unstimulierter PDC, die in Gegenwart von anti-CD303-mAk oder Isotypkontrolle für 15 Stunden bei 37°C inkubiert worden waren. Der Affymetrix-HG-U133A-Microarray repräsentiert mit 22283 Sonden circa 14000 humane Gene. Dargestellt sind die von dem „Microarray Suite (MAS) 5.0“-Algorithmus generierten „detection calls (engl.)“, die die Hybridisierung einer Sonde als präsent, fehlend oder marginal präsent statistisch bewerten. Dargestellt ist die Anzahl der Gene, die durch Zugabe von anti-CD303-mAk im Vergleich zur Isotypkontrolle in CpG-stimulierten und unstimulierten PDC mindestens zweifach reguliert worden waren. Außerdem ist die Anzahl der durch CpG-Stimulus regulierten Gene, die in Isotypkontroll-mAk behandelten PDC als mindestens zweifach reguliert auffielen, aufgelistet.

	Isotyp	anti- CD303	CpG Isotyp	CpG anti- CD303	CpG vs Isotyp	anti- CD303 vs Isotyp	anti- CD303 CpG vs Isotyp CpG
Detektion („call“)	22283 Sonden insgesamt						
präsent	10957	11350	11382	10782			
fehlend	10977	10542	10545	11148			
marginal	349	390	356	353			
regulierte Gene					721	97	179

Die Analyse der Genregulation erfolgte unter Verwendung der High Performance Chip Data Analyse (HPCDA), wobei eine relationale Database alle Gene mit einer signifikanten Regulation filtert. Zusätzlich musste die Regulation signifikanter Gene eine zweifache Veränderung erfahren. Der Vergleich zwischen CpG-stimulierten und unstimulierten PDC zeigte eine Genregulation von 721 Genen. Nach anti-CD303-Behandlung wurden 97 Gene in unstimulierten PDC reguliert. Hingegen wurden 179 Gene reguliert, wenn CpG-stimulierte mit CpG-stimulierten, anti-CD303 Antikörper behandelten PDC verglichen wurden.

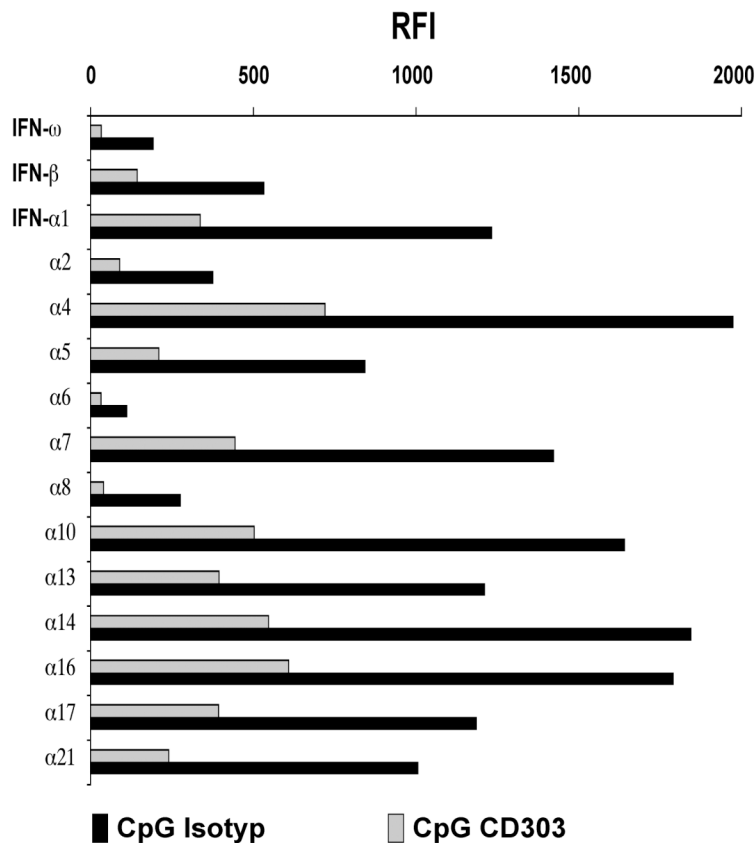


Abbildung 2: Die Bindung von anti-CD303-mAk an CD303 inhibiert die Induktion der IFN-I Gene in CpG-stimulierten PDC.

Dargestellt im Säulendiagramm sind die relativen Signalfluoreszenz-Intensitäten („relative fluorescence intensities“ (RFI), engl.) der dreizehn IFN- α -Gene sowie IFN- β und IFN- ω für anti-CD303-mAk (grau) und Isotypkontrolle behandelten PDC (schwarz) nach 15 Stunden CpG-Stimulation bei 37°C. Die RFI wurden durch den MAS 5.0 Algorithmus bei der Affymetrix-HG-U133A-Microarrayanalyse ermittelt.

Die Behandlung von PDC mit CpG in Gegenwart von Isotypenkontrollantikörper führte zur Induktion aller IFN-I-Subtypen, einschließlich IFN- ω und IFN- β . Die Ligation mit anti-CD303 Antikörper führte dagegen zu einer Inhibition der Induktion all dieser Transkripte wie in Abbildung 2 dargestellt.

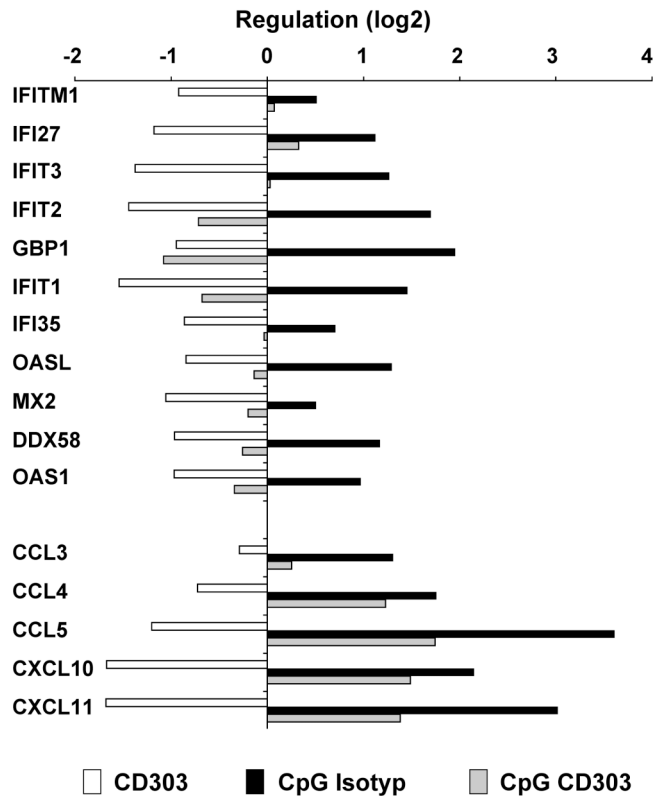


Abbildung 3: Inhibition der Induktion von IFN-I induzierbaren Genen durch anti-CD303-mAk Behandlung in CpG-stimulierten und unstimulierten PDC.

Das Säulendiagramm zeigt die durch anti-CD303-mAk Behandlung erfolgende Regulation der Transkripte für beschriebene IFN-I induzierbare Gene. Dargestellt ist die log₂-Regulation der IFN-I induzierbaren Gene, die bei der Affymetrix-HG-U133A-Microarrayanalyse mindestens in CpG-stimulierten oder unstimulierten PDC im Vergleich zur Isotypkontrolle um das zweifache reguliert worden waren. Gezeigt wird die Genregulation durch Behandlung mit anti-CD303-mAk in CpG-stimulierten (grau) und unstimulierten (weiß) PDC sowie die Induktion der IFN-I induzierbaren Gene durch CpG-Stimulation in Isotypkontrolle behandelten PDC (schwarz).

Die Ausprägung der „IFN-I response genes“ (engl.), die auch als IFN-I Signaturgene bezeichnet werden [Marshak-Rothstein 2006], wurde durch CpG-Stimulus induziert [Der et al. 1998]. Darunter fanden sich Transkripte für 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS1) und Synthetase-like Protein (OASL), MX2 und IFIT1-3. Den gleichen induzierenden Effekt des CpG-Stimulus zeigte sich für eine Gruppe von Chemokinen bestehend aus CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 und CXCL11. Die Ligation von CD303 in unstimulierten PDC führte zu einer Herunterregulation dieser Gene, während in CpG-stimulierten PDC die Ligation von CD303 die Induktion dieser Chemokine inhibierte oder das Transkriptionsniveau dieser Transkripte unter das von unstimulierten Zellen

senkte (Abbildung 3). Die Ligation von CD303 führt somit zu einer dem CpG-Stimulus inversen Regulation.

Tabelle 3: Validierung der Genregulationsdaten der Affymetrix-HG-U133A-Microarrayanalyse mittels semi-quantitativer RT-PCR für die Transkripte CCL5, CXCL11 und CLEC4A (DCIR).

Die Tabelle listet die durch Behandlung mit anti-CD303-mAk im Vergleich zur Isotypkontrolle in CpG-stimulierten PDC erfolgte Regulation auf. Gezeigt sind die Regulationen der Transkriptmenge für CCL5, CXCL11 und CLEC4A (DCIR) in der Affymetrix-HG-U133A-Microarrayanalyse und die Regulationsdaten einschließlich Abweichung und maximaler Abweichung (d_{\max}) der semi-quantitativen RT-PCR.

GEN	log2-Regulation		
	Microarray	RT-PCR	d_{\max} RT-PCR
CCL5	- 1,4	- 1,2 \pm 0,01	0,44
CXCL11	- 1,6	- 3,6 \pm 0,02	0,51
CLEC4A	+ 2,4	+ 2,4 \pm 0,02	0,54

Die Genregulationsdaten wurden für CCL5, CXCL11 und CLEC4A (DCIR) mittels semi-quantitativer RT-PCR validiert. Hierfür wurden CD303-behandelte, CpG-stimulierte PDC und CpG-stimulierte PDC verglichen (Tabelle 3). Während CCL5 und CXCL11 nach CD303-Ligation in der Microarrayanalyse herunterreguliert wurden, kam es für CLEC4A zu einem Anstieg der Transkriptmenge. Dabei deckten sich die mittels RT-PCR generierten Regulationsdaten in der Größenordnung mit den Microarray-Daten. Zusätzlich wurden für vier Spender die Proteinmengen von CCL5, CXCL11 und IFN-I im ELISA quantifiziert. Es zeigte sich, dass analog zu den Transkriptmengen von CCL5, CXCL11 und IFN-I-Genen, die CD303-Ligation in CpG-stimulierten PDC zu einem Rückgang der sezernierten Proteinmengen führte. Somit verhielt sich das Profil der Genausprägung von CpG-stimulierten, anti-CD303-behandelten PDC ähnlich zum Profil der Genausprägung von unstimulierten, Kontrollantikörper-behandelten PDC.

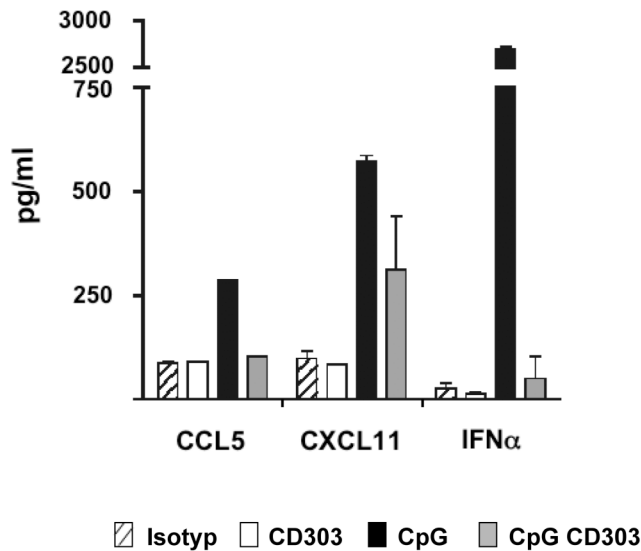


Abbildung 4: Inhibition der Chemokinproduktion von CCL5, CXCL11 und IFN- α nach der Behandlung von CpG-stimulierten PDC mit anti-CD303-mAK.

Das Säulendiagramm fasst die mittels ELISA als Triplikate bestimmten Proteinkonzentrationen für CCL5, CXCL11 und IFN- α zusammen. Die Chemokinkonzentration in Medienüberständen von PDC nach 15 Stunden Inkubation wurden von anti-CD303 behandelten, CpG-stimulierten (grau) und unstimulierten PDC (weiß) bestimmt. Zudem sind die Chemokinkonzentrationen im Medienüberstand unstimulierter PDC (gestreift) und CpG-stimulierter PDC (schwarz) in Gegenwart von Isotypkontroll-mAk gezeigt.

3.2 TyrosinphosphorylierungsSignatur

Nachdem die Analyse der Genregulation ergeben hatte, dass die Bindung von mAk an CD303 primär IFN-I Gene und IFN-I induzierbare Gene reguliert, sollte nun die unmittelbaren Veränderungen in PDC nach Ligation von mAk an CD303 untersucht werden. Ausgangspunkt hierfür war die bereits beschriebene CD303 vermittelte TyrosinphosphorylierungsSignatur [Dzionek et al. 2001]. Zur Charakterisierung der TyrosinphosphorylierungsSignatur, die durch die Ligation von Antikörper an CD303 in PDC induziert wird, wurde folgende Herangehensweise gewählt: CD304-MB angereicherte PDC wurden mit anti-CD303- oder anti-Cytokeratin-Antikörpern als Isotypkontrolle für 5 Minuten stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt. Dabei erhielt man erwartbarer Weise gleiche Konzentrationen für anti-CD303- und anti-Cytokeratin-stimulierte-Lysate. Die Lysate wurden

Immunoblotanalysen unterworfen, um den optimalen anti-Phospho-Tyrosin-Antikörper-Titer zu bestimmen, bei dem die Kontrollantikörper-behandelte Probe keine Signale hervorrief. Somit konnte die Signifikanz der Phospho-Tyrosin-Ereignisse, die in der anti-CD303-mAk behandelten Probe detektiert werden konnten, gesteigert werden. Dazu wurden die PDC-Lysate doppelt im SDS-PAGE größenfraktioniert, das eine für die Immunoblotanalyse, das andere für eine Coomassie-Färbung. Die Immunoblots dienten als Matrize für die Extraktion der entsprechenden Proteine aus dem Coomassie-gefärbten Gelen.

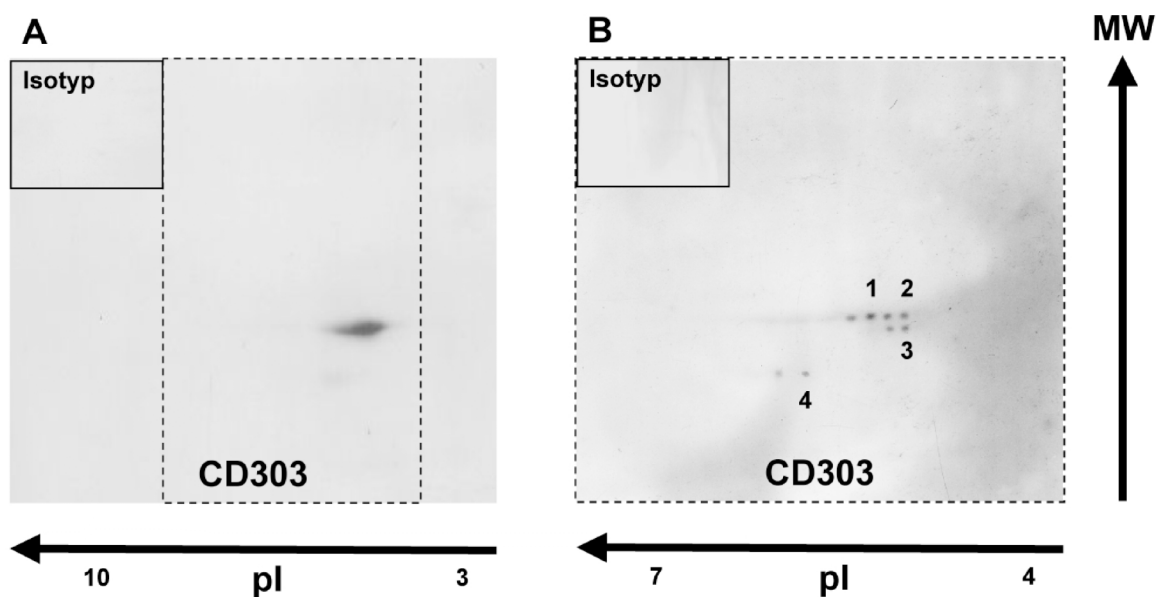


Abbildung 5: Identifizierung von Protein-Tyrosin-Phosphorylierungsereignissen nach anti-CD303-mAk-Ligation an CD303 in PDC.

Gezeigt ist die Phospho-Tyrosin-spezifische Immunoblotanalyse von PDC, die für 5 min bei 37°C mit Isotypkontrolle oder anti-CD303-mAk inkubiert worden waren. Zellen wurden nach der Inkubation lysiert und die Lysate über den Bereich pH 3-10 (A) bzw. pH 4-7 (B) iso-elektrisch fokussiert sowie im SDS-PAGE größenfraktioniert. Nach Transfer auf PVDF-Membran wurde mittels Phospho-Tyrosin-spezifischen-mAk-(Klon PY20)-Meerrettichperoxidase-Konjugat (HRP) und ECL-Substrat der Anstieg der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung detektiert. Der Titer des PY20-HRP-Konjugates war zuvor bestimmt worden, bei dem in der Isotypkontroll-behandelten Probe (Inlays oben links von (A) und (B)) keine oder nur wenige Tyrosin-Phosphorylierungen detektiert werden konnten. Die mit (1-3) gekennzeichneten Phospho-Tyrosin-Ereignisse wurden als cytoplasmatisches Aktin, das mit (4) gekennzeichnete als Proteasom-Aktivator-Untereinheit-1 (engl. „proteasome activator subunit 1“) bestimmt.

Abbildung 5 zeigt Phospho-Tyrosin-spezifische Immunoblots von PDC-Lysaten, die entweder mit Kontrollantikörper oder mit anti-CD303 für 5 Minuten stimuliert worden waren. Identifiziert wurden die Proteine mittels der „peptide mass

fingerprint“-Analyse (engl.). Das ist eine Methode, bei der die Proteine nach enzymatischen Verdau im Massenspektrometer untersucht werden und anhand von Abgleichen mit Datenbanken das identifizierte massenspektrometrische Profil einem Protein zugewiesen wird. Dabei wird mittels „Mowse-Score“ die Signifikanz wiedergegeben, wobei ein „Mowse-Score“ größer 63 mit einer Wahrscheinlichkeit von p kleiner 0,05 als signifikant angesehen werden kann. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse identifizierter Tyrosin-Phosphorylierungs-Kandidaten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht der Tyrosin-Phosphorylierungsereignisse nach anti-CD303 Behandlung von PDC.

Die Tabelle zeigt die Proteine, die nach anti-CD303-mAk Behandlung innerhalb von fünf Minuten an Tyrosinen phosphoryliert werden. Hierzu wurden PDC Lysate mittels SDS-PAGE größenfraktioniert, in einigen Fällen mit einer vorherigen iso-elektrischen Fokussierung. Parallel behandelte Gele wurden entweder Coomassie-gefärbt oder für eine Phospho-Tyrosin-spezifische Immunoblotanalyse auf PVDF-Membranen transferiert. Die Phospho-Tyrosin-Immunoblotanalysen wurden als Matrizen zur Extraktion von korrespondierenden Proteinen aus den Coomassie-gefärbten Duplikatgel verwendet. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF. Dargestellt sind der Signifikanzwert (engl. „Mowse score“, mit einer Signifikanz von $p < 0,05$, wenn der „Mowse score“ über 64 beträgt), der GenBank-Eintrag und das errechnete Molekulargewicht.

Tyrosin-Phosphorylierung	Signifikanz	GenBank ID	Masse (kDa)
alpha Aktinin 1	90	gi 13097756	104
beta Aktin	178	gi 14250401	41
gamma Aktin	221	gi 54696574	42
alpha Tubulin	69	gi 7428031	52
beta Tubulin	72	gi 340021	51
Profilin	138	gi 5542166	15
Proteasom-Aktivator-Untereinheit-1	119	gi 5453990	29
schwere Clathrin-Kette	118	gi 4758012	193

Identifiziert wurden die cytoskeletalen Proteine alpha Aktinin, beta und gamma Aktin (cytoplasmatisches Aktin), alpha und beta Tubulin sowie Profilin. Außerdem konnten die Proteasom-Aktivator-Untereinheit-1 und die schwere Clathrin-Kette (CHC) als Tyrosin-Phosphorylierungs-Kandidaten identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden exemplarisch validiert für die CHC. Hierzu wurden PDC in Gegenwart von anti-CD303-Antikörpern für 0, 5 und 10 Minuten stimuliert. Die Zellen dienten als Material für eine mit anti-CHC-(Klon X22)-

Antikörpern durchgeführte Immunopräzipitation. Die CHC-Immunpräzipitate wurden durch Immunoblotanalyse (Klon TD.1) visualisiert und der Tyrosin-Phosphorylierungs-Status mittels PY20 Immunoblotanalyse kontrolliert.

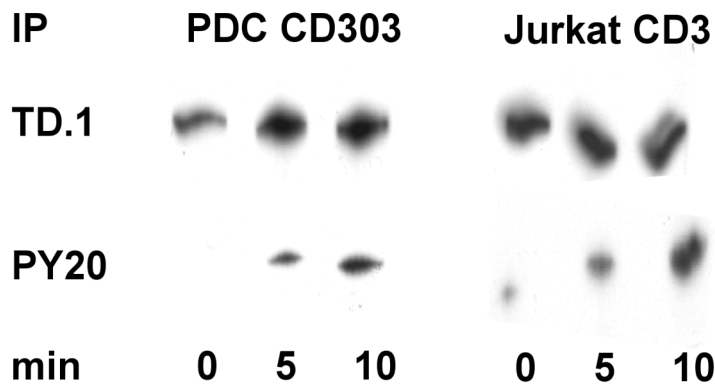


Abbildung 6: Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung der schweren Clathrin-Kette (CHC) in PDC nach anti-CD303 Behandlung.

Gezeigt sind die Immunoblotanalysen von anti-CHC-(Klon X22)-Immunopräzipitaten aus PDC (links) und Jurkat-Zellen (rechts), die mit anti-CD303-mAk bzw. anti-CD3-mAk für 0, 5 und 10 min bei 37°C inkubiert worden waren. Der Nachweis der CHC erfolgte mit anti-CHC-spezifischen mAk (Klon TD.1) und anti-IgG1-spezifischen Meerrettich-Konjugat. Außerdem wurde das Tyrosin-Phosphorylierungsniveau der CHC-Immunopräzipitate mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen mAk-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Klon PY20) bestimmt.

Wie in Abbildung 6 gezeigt, weist die aus PDC-Lysaten immunopräzipitierte CHC ohne Behandlung mit anti-CD303-mAk keine Tyrosin-Phosphorylierung auf, während es nach 5 Minuten anti-CD303-Ligation zu einer Detektion eines Phospho-Tyrosin-Signals kommt, das entsprechend nach 10 Minuten anti-CD303-Behandlung an Intensität weiter zunimmt. Ein ähnliches Tyrosin-Phosphorylierungs-Muster war für die immunpräzipitierte CHC aus Jurkat Zellen zu beobachten, die als Kontrolle mit anti-CD3-MACSiBeads in gleichen Zeitintervallen stimuliert worden waren.

Die Ligation von anti-CD303-Konjugaten führte zu einer Ko-Lokalisation von CD303 und CHC. Dies ließ sich durch eine intrazelluläre Färbung der CHC in PDC, die nach Beladung mit anti-CD303-Konjugat für 0 beziehungsweise 10 Minuten bei 37°C inkubiert worden waren, nachweisen (Abbildung 7). Die Analyse mittels Konfokal-Lasermikroskopie zeigte eine anti-CD303-

Oberflächenfärbung. Die anti-CHC-Färbung ergab, dass die CHC auf vesikuläre Strukturen innerhalb des cytoplasmatischen Bereiches der PDC beschränkt war. Nach 10 Minuten Inkubation bei 37°C lag CD303 in kondensierten Bereichen und vesikulären Strukturen an der PDC-Membran vor. Teilweise zeigten diese Bereiche eine Ko-Lokalisierung der CHC mit CD303.

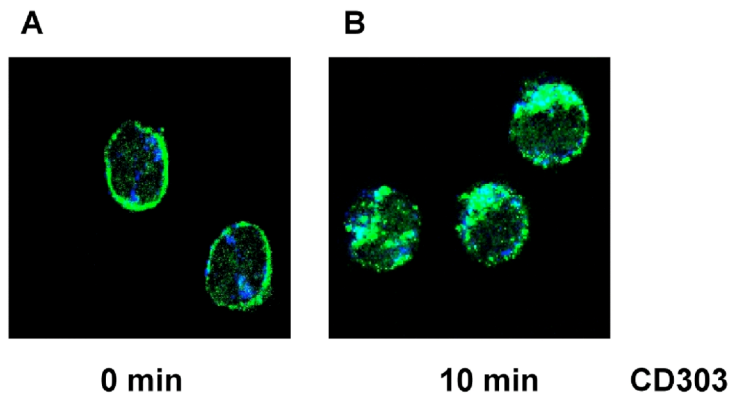


Abbildung 7: Die Ligation mit anti-CD303-mAk führt zur Ko-Lokalisierung von CD303 mit der schweren Clathrin-Kette (CHC).

PDC wurden mit anti-CD303-mAk-Konjugat (grün) bei 4°C gefärbt und für 0 (A) bzw. 10 min (B) bei 37°C inkubiert. Zellen wurden bei 0°C fixiert, danach mit Saponin permeabilisiert und mit anti-CHC-AlexaFluor647 (Klon X22) intrazellulär gefärbt (blau). Ko-Lokalisierung von anti-CD303 und anti-CHC-Konjugaten sind als Fehlfarbe Türkis dargestellt. Die Zellen wurden mit einem Konfokal-Laser-Mikroskop analysiert.

3.3 CD303 Signalosom

Die Ähnlichkeit der Tyrosinphosphorylierung der CHC in PDC und Jurkat-Zellen nach Bindung eines Antigenrezeptors ließ die Vermutung zu, dass dem Internalisierungsprozess, der nach Ligation von CD303 mit Antikörper induziert werden kann, ähnliche Prozesse zugrunde liegen. Deshalb wurde das bei der Mikroarray-Analyse generierte mRNA-Profil auf Bestandteile von Antigenrezeptorsignalmolekülen überprüft. Dabei zeigte sich, dass in PDC mRNA für Lyn, Syk (kurz für engl. „spleen tyrosine kinase“), Btk („Bruton’s tyrosine kinase“), Slp65 („Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 65 kDa“) und Phospholipase C gamma (PLC γ) 2 nachweisbar sind, typische

Komponenten des BCR-Komplexes. Dagegen wurden keine Signalmoleküle des TCR-Komplexes identifiziert.

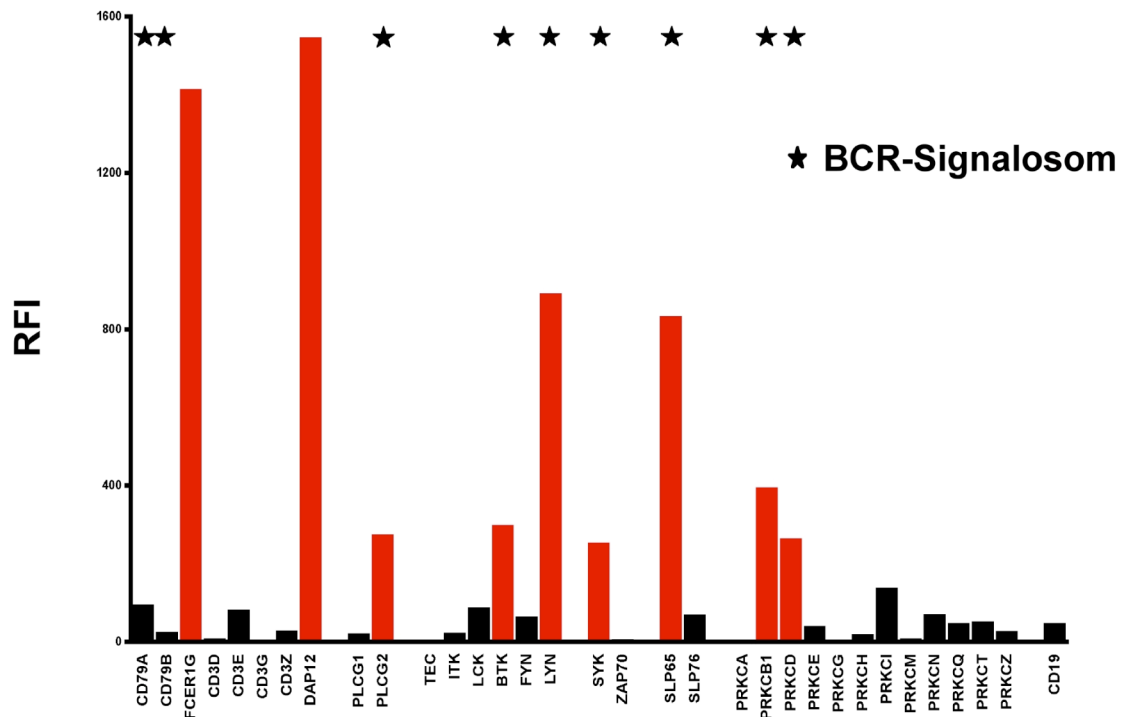


Abbildung 8: PDC prägen auf transkriptionaler Ebene ein B-Zell-Rezeptor-(BCR)-Signalosom aus.

Dargestellt im Säulendiagramm sind die relativen Signalfluoreszenz-Intensitäten („relative fluorescence intensities“ (RFI), engl.) für selektierte Transkripte, die eine Rolle in der Signaltransduktionskaskade von T-Zell-Rezeptor und B-Zell-Rezeptor spielen. Das Profil entspricht dabei dem bei der Microarray-Analyse generierten PDC-Transkriptom, wobei die Zellen in Gegenwart von Kontrollantikörpern inkubiert worden waren. Die mit einem Stern gekennzeichneten Transkripte sind zentrale Komponenten des BCR-Signalosoms. Als Kontrolle wurde die Signalintensität für CD19 aufgeführt, welches nicht von PDC dargestellt wird. Die RFI wurden durch den MAS-5.0-Algorithmus bei der Affymetrix-HG-U133A-Microarrayanalyse ermittelt.

Während für die Initialisierung der BCR-Signaltransduktionskaskade CD79a und CD79b essentiell sind, spielen für die Initiierung des TCR vermittelten Signals nach Ligation die CD3 ζ - und CD3 ϵ -Ketten eine entscheidende Rolle. Dabei steht die Interaktion zwischen Kinasen der Syk- und Src-Familie im Vordergrund, da diese zu einer Phosphorylierung der sogenannten ITAMs innerhalb der Signaladapter führen. Die Phosphorylierung des ITAM steht am Beginn der Signaltransduktionskaskaden von Antigenrezeptoren.

Das PDC Transkriptom weist die Präsenz von mindestens zwei Signaladaptern auf, die FcR- γ -Kette und DAP12 (Abbildung 8).

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen CD303 und einem Signaladapter wurde erfolglos versucht, mittels anti-CD303-Immunopräzipitation aus PDC-Lysaten die FcR- γ -Kette zu isolieren (Daten nicht gezeigt). Es ist anzunehmen, dass eine Hürde dabei die eingesetzte Ausgangsmenge der FcR- γ -Kette in PDC-Lysaten war.

Ein Vergleich der AS-Sequenz der Transmembrandomäne (TM) von Typ-II-C-Typ-Lektinen zeigte, dass eine Gruppe von Typ-II-C-Typ-Lektinen, die keine intrinsischen Signalmotive innerhalb der cytoplasmatischen Domäne tragen, eine starke Konservierung der TM aufweist. Zu dieser Gruppe zählen murines (m) Dectin-2, humanes CLEC4D und CD303 (CLEC4C). Für mDectin-2 war bereits eine Interaktion mit dem Signaladapter FcR- γ -Kette gezeigt worden [Sato et al. 2006]. In Abbildung 9 sind Teile der AS-Sequenzen der Typ-II-C-Typ-Lektine im Einbuchstabencode dargestellt.

		cytoplasmatisch	
mDectin-2	1	MVQERQSQG KGVCTLRRLWSAAVISMLLLSTCFIASCVVITYQFIMDQPSRRL	52
CD303	1	MVPEEEFPQDREKGLWWFQLKVWSMAVVSILLSSVCFIVSSVVPNNFMYSKTVKRL	55
hCLEC4D	1	MGLEKPPQSKLEGGMHP QLIPSVIAVVFILLSSVCFIASCLVTHHNFSSRCKRGTG	54
hCLEC4A	27	AASKERTAPHKSNSTGFPKLLCASLLIFFLLLAISFFIAFVIFQKYSQLEKKT	81
		<u>Transmembrandomäne</u>	

Abbildung 9: Aminosäuresequenzvergleich von C-Typ-Lektinen der humanen CLEC4-Familie und murinen Dectin-2.

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode für den amino-terminalen cytoplasmatischen Bereich sowie der Transmembrandomäne (TM) von C-Typ-Lektinen der humanen (h) CLEC4-Familie und murinen (m) Dectin-2. Homologiebereiche innerhalb der TM (einfach unterstrichen) zwischen mDectin-2, hCLEC4A (DCIR), hCLEC4D und CD303 (hCLEC4C) sind fett gedruckt. Die saure Triade (EEE) im cytoplasmatischen Bereich von CD303 ist doppelt unterstrichen.

Aus diesem Grund wurde eine mögliche Interaktion zwischen FcR- γ -Kette und CD303 in einem Transfektionsmodell von HEK293T-Zellen untersucht. Dabei galt die Hypothese, dass die Konservierung der TM von CD303, mDectin-2 und

CLEC4D für die Interaktion zwischen C-Typ-Lektin und Signaladapter essentiell ist (als Modell in Abbildung 10 dargestellt).

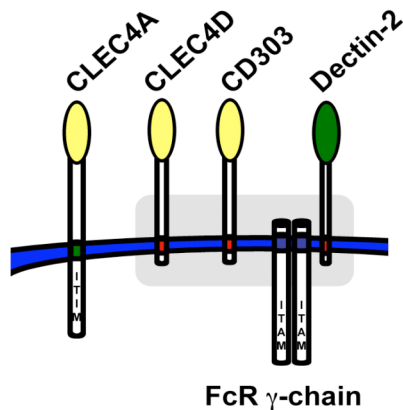


Abbildung 10: Modell der Interaktion von CLEC4-Mitgliedern und ihrer Assoziation mit einem ITAM-tragenden Adapter.

Dargestellt ist das Typ-II-C-Typ-Lektin CLEC4A (DCIR), das ein ITIM in seiner cytoplasmatischen Domäne trägt und dessen Transmembrandomäne geringe Homologie zu der Gruppe der Typ-II-C-Typ-Lektine aufweist, die sich aus CLEC4D, CD303 (CLEC4C) und Dectin-2 zusammensetzt. Für Dectin-2 ist eine Interaktion mit dem ITAM-tragenden Signaladapter FcR-γ-Kette bereits gezeigt worden.

Für die Untersuchung der Interaktion von CD303 und der FcR-γ-Kette wurde eine verkürzte Form der FcR-γ-Kette, die aminoterminal eine Hämagglutinin-(HA)-Markierung aufweist, in HEK-293T-Zellen stabil transfiziert. Danach wurden die HEK-293T-FcR-γ-Kette-Transfektanten mit CD303 stabil transfiziert. CD303 lag dabei als eine von drei Konformationen vor: Wildtypkonformation oder mit einem Austausch der TM von CLEC4D oder CLEC4A, die als Kontrolle der Interaktionsspezifität dienen sollten. Die TM der CD303-CLEC4D-Chimera zeigte dabei eine hohe Homologie zu der AS-Sequenz der TM von CD303. Während der Stabilisierung der CD303-TM-Chimera mittels Blasticidin-Selektion konnte die Ausprägung der FcR-γ-Kette nicht mehr durchflußzytometrisch bestimmt werden. Wie in Abbildung 11 ersichtlich wird, konnte die Ausprägung der FcR-γ-Kette mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen werden. Der Größenunterschied zwischen der FcR-γ-Kette aus

PDC Lysat im Vergleich zu HEK-293T-FcR- γ -Kette-CD303-TM-Chimera-Lysaten ist vermutlich durch die HA-Markierung bedingt.

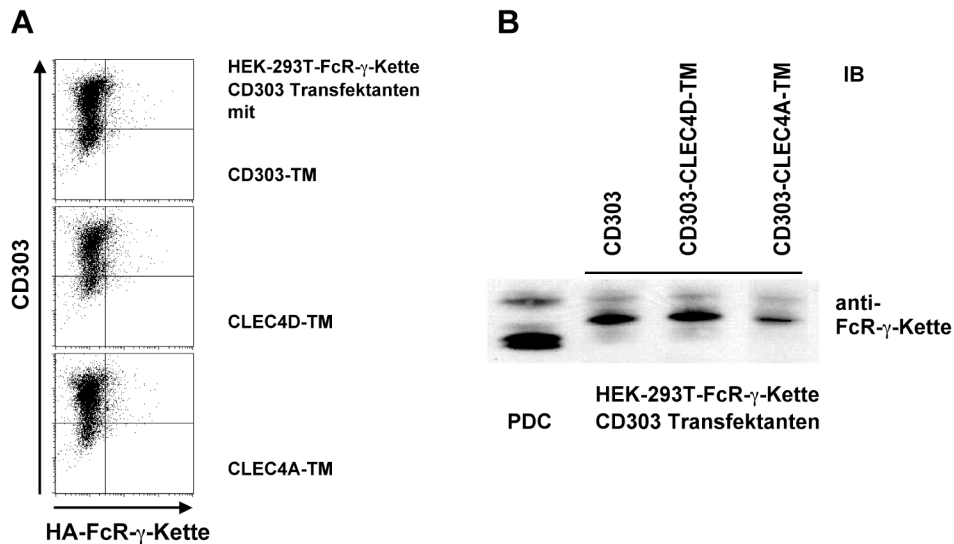


Abbildung 11: Nachweis der Ausprägung von CD303-Transmembrandomäne-Chimera und FcR- γ -Kette in HEK-293T-Transfektanten.

Unter (A) im Punktdiagramm dargestellt ist die Ausprägung von CD303 und HA-FcR- γ -Kette in HEK-293T-FcR- γ -Kette-CD303-TM-Chimera-Transfektanten. Dazu wurden die Zellen mit anti-CD303- und anti-HA-Konjugaten gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Da sich die FcR- γ -Kette in der durchflußzytometrischen Analyse nicht anfärben ließ, wurde eine anti-FcR- γ -Kette Immunoblotanalyse durchgeführt (B). Für die Analyse der Ausprägung der FcR- γ -Kette in PDC und HEK-HA-FcR- γ -Kette-CD303-Transfektanten wurden die Zellen lysiert und unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAGE größenfraktioniert und anschließend auf PVDF-Membran transferiert. Die Immunoblotanalyse wurde unter Verwendung eines FcR- γ -Kette-spezifischen mAk sowie anti-IgG1-Meerrettichperoxidase-Konjugat mit ECL als Substrat durchgeführt. Dargestellt sind die Signale der FcR- γ -Kette für PDC-Lysat sowie Lysate von HEK-HA-FcR- γ -Kette-CD303-Transfektanten. Die Transfektanten prägten dabei die Wildtyp-Aminosäuresequenz innerhalb der Transmembrandomäne (TM) aus oder die TM von CD303 entsprach der TM von CLEC4A bzw. CLEC4D.

Aus Lysaten von HEK-293T-FcR- γ -Kette-CD303-TM-Chimera wurde CD303 immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels Immunoblot unter Verwendung von anti-HA-spezifischen-Antikörpern auf die Ko-Immunopräzipitation von CD303 und FcR- γ -Kette untersucht. Dabei ließ sich die FcR- γ -Kette ausschließlich nach Immunopräzipitation von CD303 in seiner Wildtypkonformation nachweisen, während der Austausch von 6 und 19 Aminosäuren der TM im Falle von CD303-CLEC4D- und CD303-CLEC4A-

Varianten sich negativ auf die Interaktion zwischen Lektin und Signaladapter auswirkten (Abbildung 12).

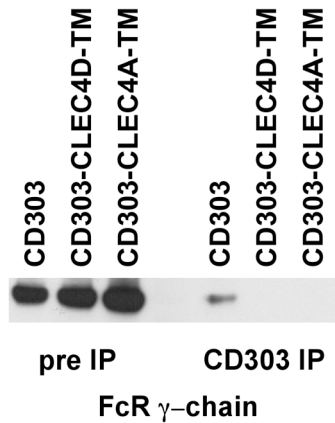


Abbildung 12: Die FcR- γ -Kette assoziiert mit CD303.

Für die Analyse der Interaktion von C303 mit der FcR- γ -Kette wurden anti-CD303-Immunopräzipitationen mit Lysaten von HEK-HA-FcR- γ -Kette-CD303-Transfektanten durchgeführt. Die Transfektanten prägten dabei die Wildtyp-Aminosäuresequenz innerhalb der Transmembrandomäne (TM) von CD303 aus oder die TM entsprach der TM von CLEC4A bzw. CLEC4D. Gezeigt ist eine Immunoblot-Analyse mittels anti-HA-Meerrettichperoxidase und ECL Substrat-Umsatz nach SDS-PAGE-Größenfraktionierung und Transfer auf PVDF-Membran der anti-CD303-Immunopräzipitate.

Die Ligation von CD303 in HEK-FcR- γ -Kette-CD303-Transfektanten führt zu einem ähnlichen Tyrosinphosphorylierungsmuster wie im Fall von PDC. Wie in Abbildung 13 dargestellt wird die Proteasom-Aktivator-Untereinheit-1 sowohl in PDC (siehe Tabelle 4) als auch nach CD303-Ligation in HEK-293T-FcR- γ -Kette-CD303-Transfektanten an Tyrosinen phosphoryliert.

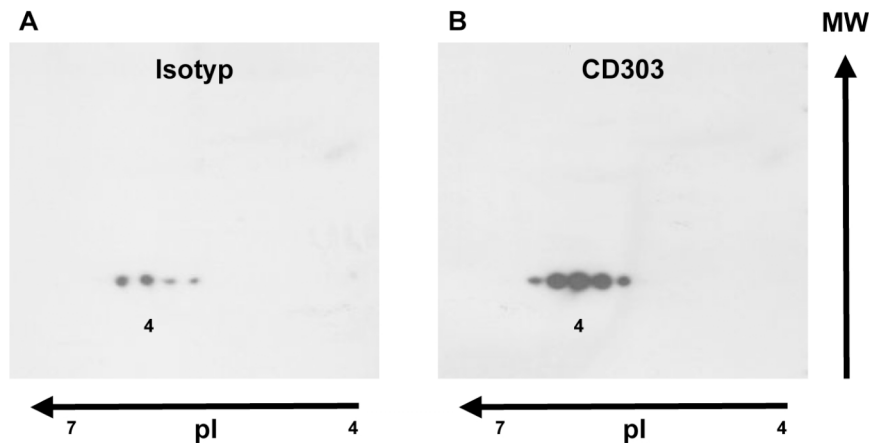


Abbildung 13: Identifizierung von Protein-Tyrosin-Phosphorylierungsereignissen nach anti-CD303-mAk-Ligation an CD303 in HEK-HA-FcR- γ -Kette-CD303-Transfektanten.

Gezeigt ist die Phospho-Tyrosin-spezifische Immunoblotanalyse von HEK-HA-FcR- γ -Kette-CD303-Transfektanten, die für 5 min bei 37°C mit Isotypkontrolle (links) oder anti-CD303-mAk (rechts) inkubiert worden waren. Zellen wurden nach der Inkubation lysiert und die Lysate über den Bereich pH 4-7 iso-elektrisch fokussiert sowie im SDS-PAGE größenfraktioniert. Nach Transfer auf PVDF-Membran wurde mittels Phospho-Tyrosin-spezifischen mAk (Klon PY20)-Meerrettichperoxidase-Konjugat (HRP) und ECL-Substrat Protein-Tyrosin-Phosphorylierungsereignisse detektiert. Der Titer des PY20-HRP-Konjugates war zuvor bestimmt worden, bei dem in der Isotypkontroll-behandelten Probe keine oder nur wenige Tyrosin-Phosphorylierungen detektiert werden konnten. Das mit (4) gekennzeichneten Phospho-Tyrosin-Ereignis wurde später als Proteasom-Aktivator-Untereinheit-1 in einer MALDI-TOF Analyse bestimmt.

Da PDC ähnliche Signalmoleküle wie B-Zellen auf transkriptioneller Ebene aufweisen, sollte nun untersucht werden, welchen Einfluß einzelne Kinasen und Adaptoren bei der Signalweiterleitung von CD303 haben. Dies wurde mittels Immunoblotanalyse untersucht. Wie in Abbildung 14 gezeigt, führt die Ligation von anti-CD303 an CD303 nach 5 Minuten zu der Tyrosinphosphorylierung von Syk an den Tyrosinresten Tyr525 und Tyr352 sowie zu der Phosphorylierung von Tyr96 von SIp65. Außerdem erfolgte ein Anstieg der Tyrosinphosphorylierungssignale von PLC γ 2 an Tyr759.

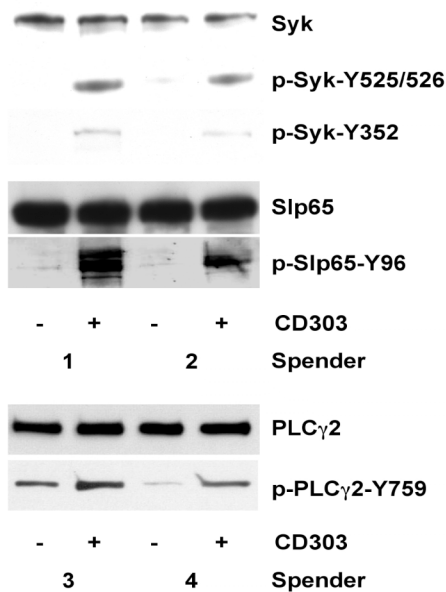


Abbildung 14: CD303-Ligation führt zu Tyrosin-Phosphorylierung von Syk, SIp65 und PLCγ2

Immunoblotanalyse von PDC-Lysaten, die für 5 min bei 37°C mit Isotypkontrolle oder anti-CD303-mAk inkubiert worden waren. Zellen wurden nach der Inkubation lysiert und die Lysate im SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf PVDF-Membran wurde mit spezifischen Ak sowie Ratte-anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-Konjugat und ECL-Substrat Syk, SIp65 (BLNK) und PLCγ2 detektiert. Darüber hinaus wurden die Lysate mittels Ak, die Phospho-Tyrosin-spezifische Varianten von Syk, SIp65 und PLCγ2 erkennen, untersucht.

Diese Ergebnisse unterstreichen die vom BCR bekannten Signaltransduktion: Die Ligation des BCR führt zur Aktivierung von Syk, das den Signaladapter SIp65 rekrutiert, was mit einer Phosphorylierung des Tyr96 korreliert. Die Rekrutierung von SIp65 dient als Ausgangspunkt für die Assoziierung von Btk und PLCγ2. Btk wird durch Syk aktiviert, was wiederum in der Aktivierung der PLCγ2 mündet. Aktivitätsabhängig setzt die PLCγ2 das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu den sekundären Botenstoffen Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) um. IP3 öffnet selektiv intrazelluläre Calcium-Kanäle, was zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentrationen führt. Die Bindung von DAG an C1-Domäne tragende Proteine hingegen führt zu deren Aktivierung, besonders die Serin-Threonin Kinasen der Proteinkinase C (PKC)-Familie. Ein Calcium-Anstieg lässt sich durch Gabe von Ionomycin induzieren und die Wirkung des sekundären

Botenstoffs DAG durch Verwendung des Phobolesters Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) nachahmen.

Deshalb wurde der Einfluss der sekundären Botenstoffe einer aktivierten PLC γ 2 auf die IFN-I-Produktion stimulierter PDC untersucht. Hierzu wurden PDC in Gegenwart von PMA oder der Kombination von PMA und Ionomycin mit CpG zur IFN-I-Produktion stimuliert. Es zeigte sich, dass die Induktion der IFN-I-Produktion in PDC durch die Gabe von PMA dosisabhängig inhibiert werden konnte und diese Inhibition unabhängig von Ionomycin erfolgte (Abbildung 15). Zwecks Vergleichbarkeit der Ansätze wurden die Zellzahlen der PDC nach Abnahme der Zellkultivierungsüberstände durchflußzytometrisch analysiert. Die PMA-induzierbare Inhibition der IFN-I-Produktion in CpG-stimulierten PDC wies auf eine mögliche Verwicklung eines Proteinkinase C-Enzymes hin, welches für die Subfamilie der novel PKC-Isozyme typisch calcium-unabhängig aktiviert werden kann.

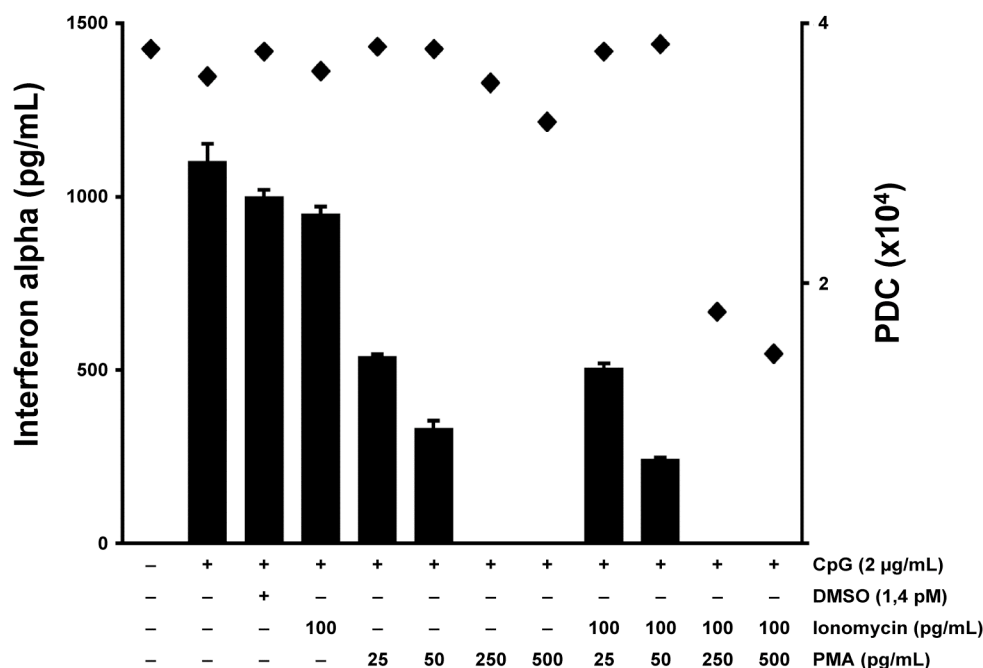


Abbildung 15: Phorbolster-Behandlung inhibiert die IFN- α -Produktion CpG-stimulierter PDC dosisabhängig.

Als Säulendiagramm dargestellt sind die IFN- α -Konzentrationen in Medienüberständen von PDC inkubiert bei 37°C für 15 Stunden mit CpG, Ionomycin und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) in den angegebenen Konzentrationen. Die IFN- α -Konzentrationen wurden mittels ELISA als Dreifachbestimmungen quantifiziert. Die Anzahl lebender Zellen (Rauten) der einzelnen Ansätze wurde durchflußzytometrisch bestimmt.

Entsprechend des mRNA-Transkriptionsprofils sowie deren Validierung auf Proteinebene durch PKC-Isotypenspezifische Immunoblotanalyse (Abbildung 8; Abbildung 16) ist die PKC delta (δ) ein Kandidat für eine PMA-induzierbare, Calcium-unabhängige Inhibition der IFN-I-Produktion.

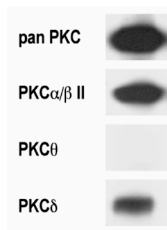


Abbildung 16: PDC prägen PKC α/β sowie PKC δ aus.

Immunoblot-Analyse von PDC Lysat unter Verwendung von pan PKC, PKC α/β , PKC θ und PKC δ spezifischen Ak. PDC-Lysate wurden durch SDS-PAGE größenfraktioniert, auf eine PVDF-Membran transferiert und auf die Ausprägung von unterschiedlichen PKC-Subtypen untersucht.

Den möglichen Einfluss einer PKC-Aktivierung auf die IFN-I-Inhibition nach CD303-Ligation wurde mittels des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid untersucht [Davis et al. 1998]. Wie in Abbildung 17 dargestellt, führte die Behandlung der PDC mit Bisindolylmaleimid zu keiner Veränderung der IFN-I-Sekretion. Es zeigte sich, dass die sezernierte IFN-I-Menge von PDC eines Spenders im Doppelansatz untersucht, unterschiedlich stark inhibiert werden konnte nach anti-CD303-Behandlung. Eine ähnliche Varianz innerhalb des anti-CD303-Konzentrationsbereiches zwischen 3 ng/ml und 0,3 ng/ml wiesen die in den Medienüberständen mittels ELISA quantifizierten IFN-I-Mengen CpG-stimulierter PDC auf, die mit 100 nM Bisindolylmaleimid behandelt worden waren. Diese Varianz erlaubte es nicht, eine Aussage über die Aufhebung der IFN-I-Inhibition durch CD303-Ligation nach Behandlung mit PKC-spezifischen Inhibitor Bisindolylmaleimid zu treffen.

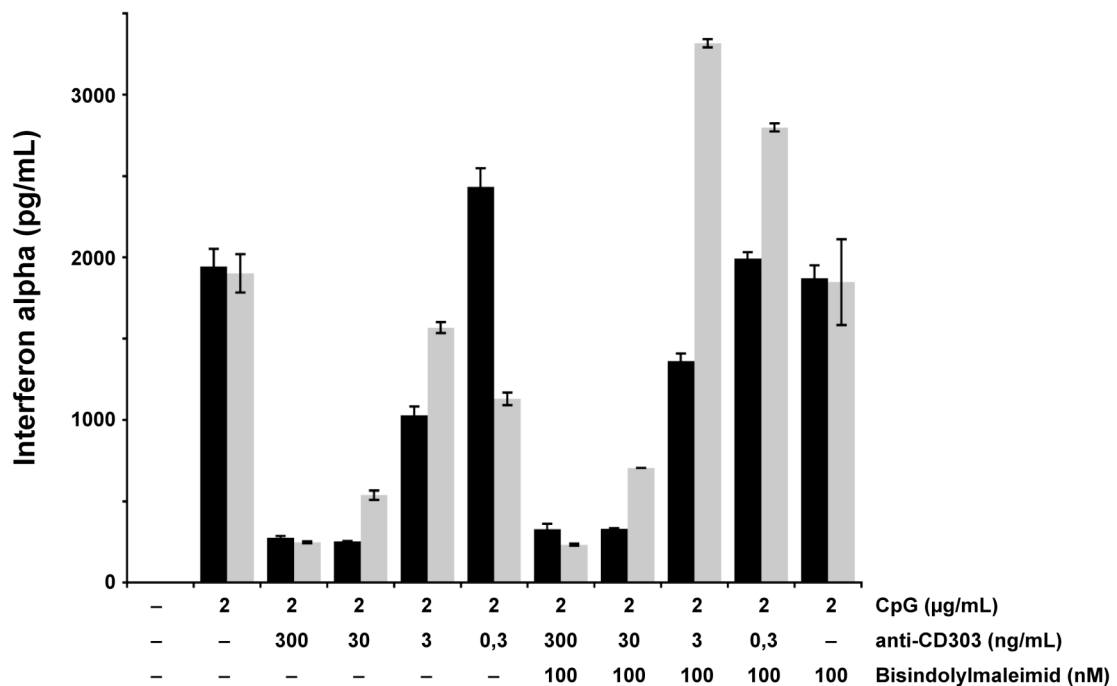


Abbildung 17: Behandlung mit Protein-Kinase-C-Inhibitor Bisindolylmaleimid hebt die anti-CD303-vermittelte Inhibition der IFN- α -Produktion von CpG-stimulierten PDC nicht auf.

Das Säulendiagramm zeigt die IFN- α -Konzentrationen in Medienüberständen von PDC eines Spenders im Doppelansatz (schwarzer und grauer Balken je Ansatz) inkubiert bei 37°C für 15 Stunden mit CpG, anti-CD303-mAk und Bisindolylmaleimid. Die IFN- α -Konzentrationen wurden mittels ELISA als Dreifachbestimmungen quantifiziert.

Da für den BCR gezeigt worden ist, dass eine PLC γ 2-Aktivität eine Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges zur Folge haben kann, wurde der Einfluß von CD303 Signaltransduktion auf die Phosphorylierung von I κ B α Ser32 hin untersucht. Die Phosphorylierung von I κ B α an Ser32 korreliert mit der Ubiquitinierung und nachfolgender proteolytischen Degradierung von I κ B α , wodurch NF- κ B p50/p65 in den Nukleus translozieren kann. Während anti-CD303-Ligation innerhalb 30 Minuten keinen Anstieg des Phosphorylierungs-Niveaus von I κ B α Ser32 verursachte, ließ sich ein Anstieg des Phosphorylierungs-Niveaus von I κ B α Ser32 nach 5 Minuten TNF α und 16 Minuten CpG-Stimulus nachweisen (Abbildung 18). Interessant war die Beobachtung, dass eine anti-CD303-Ligation 30 Minuten vor Zusatz von TNF α

und CpG-Stimulus zu einer Reduktion der Ser32-Phosphorylierungsintensitäten von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ führte.

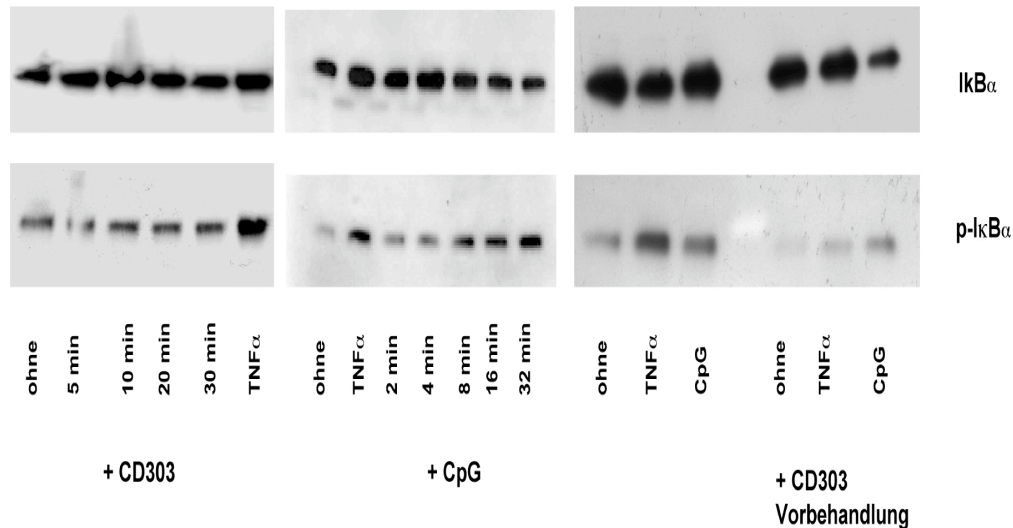


Abbildung 18: Vorbehandlung mit anti-CD303-mAk inhibiert die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -S32 nach pro-inflammatorischen Stimulus.

Die Immunoblot-Analyse zeigt die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Beladungskontrolle) und Phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -S32-Niveaus in PDC Lysaten nach Behandlung mit anti-CD303-mAk, TNF α und CpG. PDC waren hierfür mit anti-CD303-mAk für 5, 10, 20 und 30 min mit anti-CD303-mAk und mit TNF α für 5 min behandelt worden (links). Daneben wurden PDC für 2, 4, 8, 16 und 32 min mit CpG-Stimulus sowie für 5 min mit TNF α versetzt (Mitte). Der Einfluss einer anti-CD303-mAk-Vorbehandlung der PDC für 30 min vor dem Zusatz von TNF α (5 min) und CpG-Stimulus (20 min) ist rechts dargestellt.

Die hier vorgestellten Ergebnisse im Zusammenhang der Ligation von anti-CD303-mAk an CD303 führten zu einem Signaltransduktionsmodell wie in Abbildung 19 dargestellt.

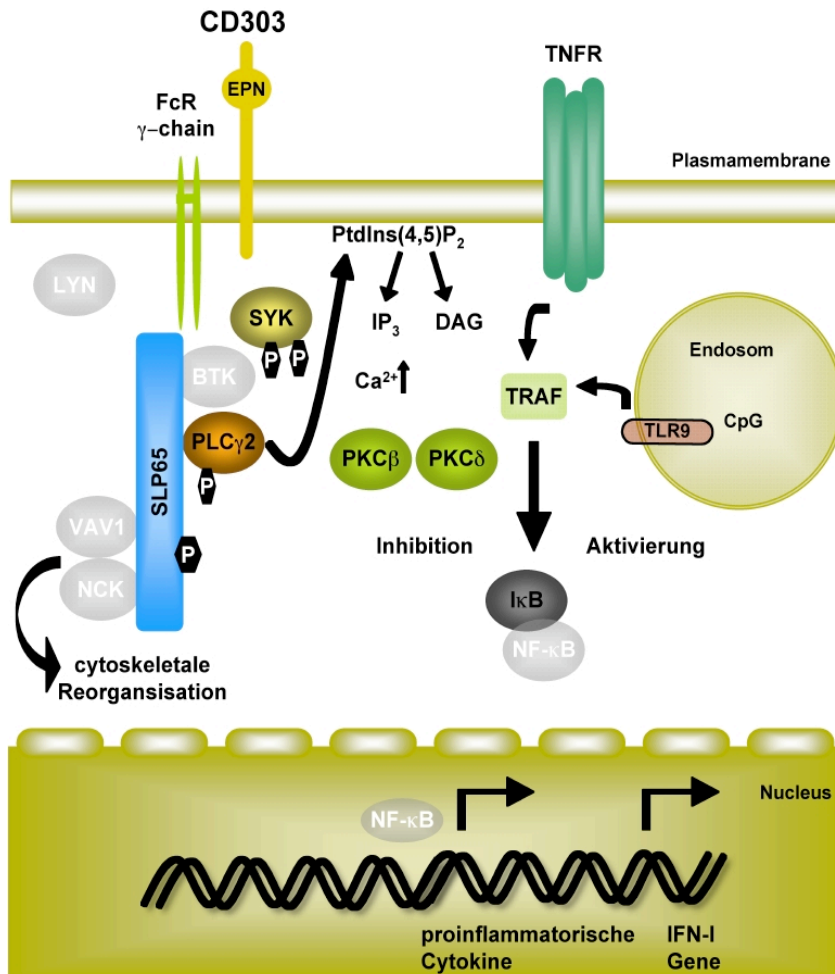


Abbildung 19: Modell der CD303-Signaltransduktionskaskade.

PDC prägen ein BCR-artiges Signalosom aus, bestehend aus Lyn, Syk, BTK, SLP65, PLC- γ 2, PKC- β und - δ . Die Ligation von anti-CD303-mAk an CD303 führt zu einer Phosphorylierung von Syk, SLP65 sowie PLC γ 2. Der PLC γ 2-Aktivierung folgt die Umsetzung von PtdIns(4,5)P₂ in die sekundären Botenstoffe DAG und IP₃. Dies führt zum einen zur Aktivierung der PKC-Subtypen, zum anderen zur Öffnung von intrazellulären Calcium-(Ca²⁺)-Kanälen, wodurch die Ca²⁺-Konzentration ansteigt. Die CD303-Signaltransduktion wirkt sich innerhalb von 30 min negativ auf die Aktivierung der kanonischen NF- κ B-Signaltransduktionskaskade aus. Die proinflammatorischen Mediatoren Tumornekrose-Faktor (TNF) α und CpG-Stimulus als Liganden von TNF-Rezeptor und Toll-like Rezeptor (TLR) 9 sind nach CD303-Ligation mit anti-CD303-mAk nur beschränkt in der Lage, die I κ B α -S32-Phosphorylierung zu induzieren. Auf transkriptionellem Niveau werden nach CD303-Ligation hauptsächlich die IFN-I-Gene und IFN-I-induzierbaren Gene reguliert.

4 Diskussion

Die CD303-Signaltransduktionkaskade verwendet ein Signalosom, das dem BCR-Signalosom ähnelt.

PDC gelten als die Hauptproduzenten von IFN-I und spielen eine zentrale Rolle an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. CD303 ist ein Typ-II-C-Typ-Lektin, welches spezifisch von humanen PDC ausgeprägt wird. Nach Bindung von Antikörpern an CD303 kommt es zur Inhibition der IFN-I-Produktion stimulierter PDC. Die durch Ligation von CD303 induzierte Signaltransduktion führt zu einem Anstieg der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und zu einem schnellen, transienten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Calciumoszillation). Die Calciumoszillation lässt sich dabei gezielt durch Verwendung von PP2, einem spezifischen Inhibitor der src-Kinasen-Familie, unterbinden [Dzionic et al. 2000, Dzionic et al. 2002, Dzionic et al. 2001].

In dieser Arbeit wurde die nach der Bindung von anti-CD303-mAk an CD303 induzierte Signaltransduktion charakterisiert. Während eine Microarray-Analyse ermöglichte, transkriptionale Veränderungen des PDC-Transkriptoms zu analysieren, wurden proteinbiochemische Untersuchungen benutzt, um das CD303-Signalsom näher zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Signaltransduktion von CD303 in vielen Aspekten der Signaltransduktion des BCR ähnelt, wenn membranständiges IgM auf B-Zellen mittels mAk verknüpft wird [Kurosaki 2000, Kurosaki 2002, Niino und Clark 2002]. So interagiert CD303 mit der FcR- γ -Kette, einem ITAM-tragenden Signaladapter. CD303-Ligation mit anti-CD303-mAk führt daneben zur Phosphorylierung von Syk, Slp65 und PLC γ 2, Kinasen und Adapter, die charakteristisch für ein B-Zell-Signalosom sind. Daneben konnte gezeigt werden, dass die nach Ligation von CD303 induzierte Protein-Tyrosin-Phosphorylierung an cytoskeletalen Proteinen sowie der schweren Clathrin-Kette stattfindet. Trotz einer starken Analogie zur Signaltransduktion des BCR ergeben sich auch Unterschiede. So zeigte sich, dass die Signaltransduktion von CD303 keinen Einfluß auf den Phosphorylierungszustand von I κ B α hat. I κ B α -Phosphorylierung ist ein

Indikator für die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges. Die IFN-I-Produktion stimulierter PDC ist zumindest teilweise transkriptionaler Regulation unterworfen, was eine zusätzliche translationale oder post-translationale Regulation der IFN-I-Produktion jedoch nicht ausschließt.

CD303 ist eine Typ-II-C-Typ-Lektin-Struktur, die spezifisch von PDC dargestellt wird. Der cytoplasmatische Bereich von CD303 weist kein derzeit bekanntes Motiv auf, das mit Signaltransduktion in Verbindung gebracht wird. Die Signaltransduktion von C-Typ-Lektinen ohne intrinsisches Signalmotiv wird häufig von Mitgliedern einer Signaladapter-Familie bestehend aus FcR- γ -Kette, CD3 ζ , CD79a und CD79b, DAP10 und DAP12 initiiert. Diese weisen sogenannte ITAMs auf, mit der Konsensus-Sequenz D/Ex₇D/Ex₂Yx₂L/Ix₇Yx₂L/I [Reth 1989], wobei die Proteinsequenz im Einzelbuchstabencode dargestellt ist und x eine beliebige AS repräsentiert. Auf transkriptionalem Niveau prägen PDC die FcR- γ -Kette und DAP12 aus. Nach vergeblichem Versuch, die FcR- γ -Kette aus primären PDC-Lysaten mittels CD303-Immunopräzipitation zu isolieren, gelang eine Ko-Immunopräzipitation mit CD303 und FcR- γ -Kette aus HEK-293T-Transfektanten. Die gezeigte Interaktion zwischen CD303 und FcR- γ -Kette war dabei spezifisch, da die Veränderung von 6 AS innerhalb der Transmembrandomäne von CD303 die Interaktion zwischen Lektin und FcR- γ -Kette aufhob. Die Ergebnisse des Experimentes deuten auf eine Interaktion zwischen CD303 und der FcR- γ -Kette hin, auch wenn eine Interaktion zwischen CD303 und DAP12 nicht ausgeschlossen werden kann. Die Interaktion läßt auf einen möglichen Initiierungsmechanismus der CD303-Signaltransduktionskaskade rückschließen, da häufig für die Phosphorylierung eines ITAMs die Interaktion zwischen einer src-Kinase und einer Syk-Familien-Kinase (Syk, ZAP-70) erfolgen muss [Horejsi et al. 2004]. Ähnlich zu CD303 führt die Ligation von mAk an ILT-7 („Immunoglobulin-like transcript-7“, engl.), das mit der FcR- γ -Kette interagiert, zur Inhibition der IFN-I-Produktion stimulierter PDC [Cao et al. 2006]. Eine weitere Ähnlichkeit in Bezug auf die Inhibition der IFN-I-Produktion stimulierter PDC, hervorgerufen durch ITAM-Adapter initiierte Signalgebung, ist die Interaktion von NKp44 und DAP12 [Fuchs et al. 2005]. Fuchs et al. zeigen, dass die Interaktion zwischen CD303

und DAP12 eher unwahrscheinlich ist, da die Oberflächendarstellung von NKp44 von der Ausprägung von DAP12 abhängig ist, während die Darstellung von CD303 in DAP12 defizienten Spendern unverändert bleibt. Die Beobachtung der Abhängigkeit zwischen Oberflächendarstellung eines C-Typ-Lektins und interagierendem Signaladapter wurde bereits gezeigt [Merck et al. 2004]. Somit verhält sich CD303 in Bezug auf die Initiierung der Signaltransduktion nach Ligation mit mAk ähnlich zum BCR, dessen Signaltransduktion von der Präsenz von CD79a und CD79b abhängt [Niir und Clark 2002].

Die Darstellung von Lyn, Syk, SIp65, Btk und PLC γ 2 in PDC gleicht der Komposition des Signalosoms eines BCR, während zentrale Komponenten des TCR-Signalosom (Itk, Lck, Fyn, ZAP70, SIp76 und PLC γ 1) fehlen. Nach der Ligation von CD303 mit mAk konnte ein Anstieg des Tyrosin-Phosphorylierungs-Grades von Syk, SIp65 und PLC γ 2 gezeigt werden, was auf eine Involvierung dieser Proteine in der CD303-Signaltransduktionskaskade deutet. Nach Bindung von mAk an den BCR werden Lyn und Syk aktiviert, was zu einer Rekrutierung des Adapterproteins SIp65 führt. SIp65, auch bekannt unter dem Namen Blnk, dient als Adapter für Btk, PLC γ 2 und VAV [Monroe 2006, Turner und Billadeau 2002]. Diese Kinasen spielen zentrale Rollen in der Signalweiterleitung innerhalb des BCR-Signalosoms. Die Tyrosin-Phosphorylierung von Syk an Tyr352 wurde in Verbindung mit der Interaktion von PLC γ beschrieben, während die Tyrosin-Phosphorylierungen an Tyr525/526 mit der enzymatischen Aktivität von Syk korrelieren [Law et al. 1996, Zhang et al. 2000]. Die Phosphorylierung an Tyr96 von SIp65 scheint eine Rolle bei der Assoziierung von Btk zu spielen [Chiu et al. 2002], während die Aktivierung der PLC γ 2, die mit einer Phosphorylierung von Tyr759 einhergeht [Watanabe et al. 2001], direkt von Btk abhängt [Fluckiger et al. 1998]. Die Aktivierung der PLC γ 2 führt in B-Zellen zu der Freisetzung der sekundären Botenstoffe DAG und IP3. Die Freisetzung von IP3 ist für die Öffnung von Calciumkanälen verantwortlich, dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, was wiederum auch für PDC nach

Ligation von CD303 mit anti-CD303-mAk gezeigt ist [Dzionic et al. 2001, Rhee 2001, Rhee und Bae 1997].

Der PLC γ 2-Aktivierung folgt die Aktivierung der PKC-Familie, die abhängig von den sekundären Botenstoffen in die Subfamilien klassische PKC (α , β _I, β _{II}, γ), novel PKC (δ , ϵ , η , θ) sowie atypische PKC (ξ , λ) unterteilt werden [Mellor und Parker 1998]. Die PKC der klassischen Familie benötigen die Bindung sowohl von Phorbol ester (DAG/PMA) oder Phosphatidylserin als auch von Calciumionen, während die PKC der novel Familie Calcium-unabhängig von Phorbol estern aktiviert werden. Die Aktivität der atypischen PKC ist DAG- und Calcium-unabhängig. Die Behandlung von stimulierten PDC mit PMA führte wie die Ligation von CD303 zur Inhibition der IFN-I-Produktion. Dies weist auf eine mögliche negative Regulationskapazität der novel PKC in PDC hin. PKC δ konnte als einzige Isoform der novel PKC-Familie als Transkript und als Protein in PDC nachgewiesen werden. In B-Zellen führt eine Deletion der PKC δ zu einer gesteigerten Interleukin-6-Produktion, die mit einer verbesserten DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors NF-IL-6 korreliert [Miyamoto et al. 2002]. Außerdem kommt es zur Produktion von Autoantikörper, die möglicherweise in direktem Zusammenhang der Ausprägung von Lupus-Phänotypen wie Immunkomplex-Typ-Glomerulonephritis und Organinfiltration durch Lymphozyten steht [Mecklenbrauker et al. 2002, Miyamoto et al. 2002]. Dies unterstreicht die Funktion der PKC δ in B-Zellen als negativer Regulator. Es bleibt spekulativ, ob die Inhibition der IFN-I-Produktion in PDC auch hier in Analogie zur B-Zelle auf eine negative Regulation durch die PKC δ vermittelt wird.

Die Ligation von membranständigem IgM mit mAk führt zu einer CME des mAk-Immunoglobulin-Komplexes [Stoddart et al. 2002]. Der Beginn einer CME lässt sich mit Hilfe des Tyrosin-Phosphorylierungsstatus der schweren Clathrin-Kette (CHC) nachweisen [Crotzer et al. 2004] und führt zu einem vesikulären Transport des BCR in „clathrin-coated-pits“ (engl.) [Salisbury et al. 1980, Vascotto et al. 2007]. In Analogie zum BCR führt die Ligation von CD303 zu einem Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung der CHC. Zusätzlich erfolgt eine Ko-Lokalisierung der Lektin-Struktur mit der CHC innerhalb von 10 Minuten.

Zudem führt die Ligation von anti-CD303-mAk an CD303 wie im Falle des BCR auch zur Tyrosin-Phosphorylierung von Tubulin und zur Tyrosin-Phosphorylierung von Aktin [Baba et al. 2003, Peters et al. 1996]. Profilin, α -Aktinin und cytoplasmatisches Aktin sind Hauptbestandteile eines auswachsenden Aktin-Filamentes [Pollard und Borisy 2003]. Für Profilin und cytoplasmatisches Aktin konnte die Tyrosin-Phosphorylierung in Abhängigkeit von konstitutiv aktiven Tyrosin-Kinasen in Tumorzellen, die ein permanentes Rearrangement des Cytoskelettes aufwiesen, gezeigt werden [Rush et al. 2005]. Darüber hinaus ist der vesikuläre Transport des BCR in das späte endosomale Kompartiment abhängig von dem cytoskeletalen Rearrangement, was auch für internalisiertes CD303 zutreffend scheint [Brown und Song 2001, Dzionek et al. 2001].

Die Analogie zwischen BCR und CD303-Signalosom wird auf der Ebene des kanonischen NF- κ B-Weges gebrochen. Während die Ligation des BCR als Folge den kanonischen NF- κ B-Weg aktiviert, führt die Ligation von anti-CD303-mAk an CD303 zu einer verminderten Phosphorylierung von I κ B α nach Stimulation der PDC mit TNF α oder CpG im Vergleich zu Kontrollantikörper-behandelten PDC. Die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges in B-Zellen beruht teilweise auf der Rekrutierung der I κ B-Kinase durch PKC β in die „lipidrafts“ (engl.) [Su et al. 2002]. Außerdem spielt in B-Zellen die Aktivität der PLC γ 2 eine tragende Rolle [Turner und Billadeau 2002], wobei im Allgemeinen der Entwicklungszustand der B-Zelle ausschlaggebend für die Regulation des kanonischen NF- κ B-Weges zu sein scheint [Saijo et al. 2003]. Der Phosphorylierungsstatus von I κ B α ist ein indirektes Maß einer NF- κ B-Aktivierung, da der Phosphorylierungsgrad von I κ B α an Ser32 mit dem Grad der Ubiquitinierung und somit dem proteasomalen Abbau des Inhibitors korreliert [Baeuerle und Baltimore 1988]. Die reduzierte Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Weges korreliert dabei mit einer verminderten Darstellung der Transkripte für das NF- κ B Marker Gen CCL5 (RANTES) [Xia et al. 1997]. Die Ergebnisse der Microarray-Analyse konnten mittels semi-quantitativer RT-PCR sowie mittels ELISA validiert werden.

Die Microarray-Analyse des Einflusses einer anti-CD303-mAk-Behandlung von CpG-stimulierten PDC ergab eine Regulation beschränkt auf IFN-I-Transkripte und IFN-I-Signatur-Gene [Marshak-Rothstein 2006]. Von etwa 11.000 Transkripten, die vom MAS-5.0-Algorithmus als „präsent“ eingestuft worden waren, wurden im Vergleich zwischen PDC mit anti-CD303-mAk-Behandlung mit Kontrolle 97 Gene reguliert. Im Falle CpG-stimulierter PDC mit anti-CD303-mAk-Behandlung verglichen mit der Kontrolle waren 179 Gene mindestens um das zweifache reguliert. CpG-Stimulus führte im Vergleich der Isotypkontrolle-behandelten Probe zu einer mindestens zweifachen Regulation von 721 Genen. Für die meisten Gene kam es dabei zu einer Abnahme der Transkriptmenge nach anti-CD303-mAk-Behandlung. Ito et al. zeigten eine Induktion aller IFN-I-Subtypen in PDC nach CpG-Stimulation [Ito et al. 2006]. Diese Induktion wird durch eine anti-CD303-mAk-Behandlung inhibiert. Die transkriptionale Ausprägung von IFIT1-3, GBP1, IFI27 und IFI35 sowie der Chemokine CCL3-5, CXCL10 und CXCL11 wird nach einer anti-CD303-mAk-Bindung an CD303 sowohl in CpG-stimulierten wie unstimulierten PDC inhibiert. Neben der Ausprägung von den IFN-I-Genen selbst wird die Darstellung von hauptsächlich IFN-I-Signatur-Genen durch die anti-CD303-Behandlung gemindert [Baechler et al. 2003, Der et al. 1998]. Daher lässt sich folgern, dass die Inhibition der IFN-I-Produktion CpG-stimulierter PDC zumindest teilweise auf transkriptionaler Ebene erfolgt.

Während der Zusammenfassung dieser Arbeit wurde eine Studie von Cao et al. publiziert, die im Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen die Ausprägung eines BCR-artigen Signalosoms in PDC zeigen [Cao et al. 2007]. Cao et al. zeigen, dass CD303 mit der FcR- γ -Kette interagiert und die Ligation von anti-CD303-mAk an CD303 eine Phosphorylierung von Syk, Slp65 (Blk), VAV1, PLC γ in PDC induziert. Den Ergebnissen von Cao et al. zufolge führt die CD303-Ligation zu einer verminderten Ausprägung von TNF α und IL-6 auf Proteinniveau in CpG-stimulierten PDC. Dabei ist das durch CD303 nach Bindung von anti-CD303 induzierte Signal bis zu 4 Stunden nach Stimulation in der Lage, die sezernierten Mengen an IFN-I, TNF α und IL-6 zu senken. Cao et al. argumentieren, dass die CD303-Signaltransduktion wahrscheinlich PKC β -

abhängig den CARMA1/BCL-10/MALT1-Komplex induziert, was für ITAM-vermittelte Signaltransduktionskaskaden anderer Immuno-Rezeptoren bereits gezeigt ist [Humphrey et al. 2005, Lanier 2003, Ravetch und Lanier 2000]. Diesem Argument folgend, wäre eine Induktion des kanonischen NF- κ B-Weges die Folge [Colonna 2007, Sommer et al. 2005], was im Widerspruch zu der hier gezeigten Senkung des Phosphorylierungsniveaus von I κ B α nach anti-CD303-Behandlung steht und nicht die verminderte Sekretion von TNF α und IL-6 ihrer eigenen Studie erklären kann [Collart et al. 1990, Libermann und Baltimore 1990, Shakhov et al. 1990, Shimizu et al. 1990].

PDC in ihrer Funktion als IFN-I-Produzenten sind wahrscheinlich maßgeblich an Krankheiten wie Kikuchi-Lymphadenitis, SLE und Psoriasis beteiligt [Blomberg et al. 2001, Facchetti et al. 1989a, Farkas et al. 2001, Feller et al. 1983, Gilliet et al. 2004]. Besonders die Pathogenese von SLE scheint mit der IFN-I-Produktion stimulierter PDC verbunden [Blanco et al. 2001]. SLE ist eine häufig auftretende weltweite Autoimmunkrankheit und gekennzeichnet durch erhöhte Auto-Antikörper-Titer von anti-nukleären-Protein- und anti-DNA-Antikörpern [Bootsma et al. 1996, Lawrence et al. 1998]. Anti-DNA-Antikörper und DNA-Komplexe gehören zu den Stimuli, die in PDC die IFN-I-Produktion induzieren [Rönnblom et al. 2003]. SLE-Patienten-Seren weisen sich durch erhöhte IFN-I-Titer aus, wobei diese mit dem Verlauf und Schweregrad der Krankheit korrelieren [Bengtsson et al. 2000, Rönnblom et al. 1990]. Während PDC-Frequenzen im Blut von SLE-Patienten sinken, kommt es zu einer gesteigerten Infiltration lymphatischer Organe und dermalen Läsionen [Blomberg et al. 2001, Farkas et al. 2001]. Die durch anti-CD303-Behandlung induzierbare IFN-I-Inhibition stimulierter PDC bietet somit eine therapeutische Interventionsmöglichkeit bei SLE-Patienten.

Abschließend ein Ausblick auf Fragen, die sich durch diese Arbeit ergeben haben: Der Nachweis einer transkriptionalen Regulation der IFN-I- und IFN-I-Signatur-Gene erfordert eine weiter führende Analyse des zugrunde liegenden Mechanismus. Denkbar ist dabei eine Beeinflussung regulatorischer Elemente und Transkriptionsfaktoren, wie dies für die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-IL-6 im Falle der PKC δ -vermittelten Regulation der IL-6-Produktion bereits

diskutiert wurde [Miyamoto et al. 2002]. Dies ließe sich durch eine differenzierte Darstellung der Bindungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren mittels Chromatin-Immunopräzipitation-(CHIP)-Technologie untersuchen. Daneben führt die Hypermethylierung von DNA und Histonen zur Ausprägung von Heterochromatin, wobei es sich um Bereiche der DNA handelt, die keine oder sehr verminderte Transkriptionsaktivität der darin befindlichen Gene aufweisen [Smale 2003]. Ein weiterer Aspekt bei der Genregulation stellt die RNA-Interferenz dar [Sontheimer und Carthew 2005]. Dabei regulieren eukaryotische Zellen die Transkriptinsniveaus einzelner Gene durch gezielte Degradation, die von 21-28 Nukleotid-langen RNA-Strängen und dem sogenannten „RNA-induced-silencing-complex“ (RISC, engl.) ausgeht [Pei und Tuschl 2006]. Handelsübliche miRNA-Arrays bieten somit eine Plattform, mit der sich die differentielle Regulation des PDC-Transkriptoms zusätzlich analysieren ließe.

Ausgehend von der in dieser Arbeit dargestellten spezifischen Interaktion von CD303 und der FcR- γ -Kette, stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit geladener AS-Reste innerhalb der TM von C-Typ-Lektinen und deren Signaladaptoren. Während für die Interaktion von Dectin-2 und FcR- γ -Kette der Arginin-Rest innerhalb der TM von Dectin-2 essentiell scheint, ist die Interaktion zwischen CD303 und FcR- γ -Kette nicht zwingend vom Lysin-Rest abhängig [Kanazawa et al. 2004, Kanazawa et al. 2003]. Eine Interaktionsanalyse von CD303 und FcR- γ -Kette ist entsprechend wünschenswert, um den Interaktionsmechanismus von CD303 und Signaladapter näher zu charakterisieren.

Die Identifizierung des CD303-Signalsoms bestehend aus Komponenten des BCR-Komplexes stellt eine Basis für weitere Untersuchungen dar. Ähnlich wie die Ligation von mAk an CD303 bei humanen PDC führt die Bindung von mAk an den Maus-spezifischen Rezeptor Siglec-H zur Inhibition der IFN-I Produktion in PDC von Mäusen. Siglec-H aktiviert DAP-12-vermittelt Syk und wird nach der Bindung von mAk schnell internalisiert [Blasius und Colonna 2006]. Die Analogie zwischen CD303 und Siglec-H läßt die Spekulation zu, dass beiden Rezeptoren ein ähnlicher Signalmechanismus unterliegt. Eine detaillierte

Untersuchung des Signaltransduktionsmechanismus von Siglec-H in Maus-Modellsystemen, in denen einzelne Komponenten des BCR-Komplexes genetisch modifiziert wurden, könnten somit konservierte Mechanismen zwischen CD303 und Siglec-H aufdecken. Ausgehend von der Phorbol-ester-vermittelten Inhibition der IFN- γ Produktion wären auch in diesem Fall die bereits diskutierten PKC δ -knock-out-Mäuse ein sinnvoller Ansatzpunkt.

Abstract

Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the main type I interferon (IFN-I) producers and play a central role in innate and adaptive immunity. CD303 (BDCA-2) is a type-II c-type lectin specifically expressed by human PDC. CD303 signaling induces tyrosine phosphorylation and src-kinase dependent calcium influx as was shown previously. Crosslinking CD303 results in the inhibition of IFN-I production in stimulated PDC.

In this study it is demonstrated that PDC express a signalosome similar to the BCR signalosome, consisting of Lyn, Syk, Btk, Slp65 (Blnk) and PLC γ 2. CD303 associates with the signaling adapter FcR γ -chain. Triggering CD303 leads to tyrosine phosphorylation of Syk, Slp65, PLC γ 2 and cytoskeletal proteins. Analogous to BCR signaling, CD303 signaling is likely linked with its internalization by clathrin-mediated-endocytosis. The inhibition of IFN-I production by stimulated PDC can be induced by phorbol ester treatment, thus mimicking CD303 signaling and suggesting an involvement of protein kinase C members. Furthermore, CD303 signaling leads to reduced levels of transcripts for IFN-I genes and IFN-I responsive genes, indicating that the inhibition of IFN-I production by stimulated PDC is at least partially regulated at the transcriptional level. In contrast to BCR signaling, CD303 signaling appears to extenuate the activation of the NF- κ B pathway in PDC, implying the inhibition of IFN-I production is likely linked to early CD303 signaling events.

These results support a possible therapeutic value of an anti-CD303 monoclonal antibody strategy, since the production of IFN-I by PDC is considered to be a major pathophysiological factor in systemic lupus erythematosus patients.

5 Literaturverzeichnis

- Akira S und Takeda K** (2004) Toll-like receptor signalling *Nat Rev Immunol.* **4**:499.
- Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Ritter R, Zukas P, Edelbaum D, Morita A und Takashima A** (2000a) Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* **275**:11957.
- Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR und Takashima A** (2000b) Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem* **275**:20157.
- Baba T, Fusaki N, Shinya N, Iwamatsu A und Hozumi N** (2003) Actin tyrosine dephosphorylation by the Src homology 1-containing protein tyrosine phosphatase is essential for actin depolymerization after membrane IgM cross-linking *J Immunol.* **170**:3762.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK und Behrens TW** (2003) Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:2610.
- Baeuerle PA und Baltimore D** (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor *Science.* **242**:540.
- Banchereau J und Steinman RM** (1998) Dendritic cells and the control of immunity *Nature.* **392**:245.
- Bangham AD und Horne RW** (1962) Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* **196**:952.
- Bates EEM, Fournier N, Garcia E, Valladeau J, Durand I, Pin J-J, Zurawski SM, Patel S, Abrams J, Lebecque S, Garrone P und Saeland S** (1999) APCs express DCIR, a novel C-type lectin surface receptor containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Immunol* **163**:1973.
- Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H und Ronnblom L** (2000) Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies *Lupus.* **9**:664.
- Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V und Banchereau J** (2001) Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus *Science.* **294**:1540.
- Blander JM und Medzhitov R** (2004) Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**:1014.
- Blasius AL und Colonna M** (2006) Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol* **27**:255.
- Blomberg S, Eloranta ML, Cederblad B, Nordlin K, Alm GV und Ronnblom L** (2001) Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus *Lupus.* **10**:484.
- Bonifacino JS und Dell'Angelica EC** (1999) Molecular Bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* **145**:923.

- Bootsma H, Spronk PE, Hummel EJ, de Boer G, ter Borg EJ, Limburg PC und Kallenberg CG** (1996) Anti-double stranded DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: detection and clinical relevance of IgM-class antibodies *Scand J Rheumatol.* **25**:352.
- Bowie A und O'Neill LA** (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**:508.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248.
- Brown BK und Song W** (2001) The actin cytoskeleton is required for the trafficking of the B cell antigen receptor to the late endosomes *Traffic.* **2**:414.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS und Gordon S** (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**:1119.
- Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, Yao Z, Zhang L, Lanier LL und Liu Y-J** (2006) Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* **203**:1399.
- Cao W, Zhang L, Rosen DB, Bover L, Watanabe G, Bao M, Lanier LL und Liu Y-J** (2007) BDCA2/Fc epsilonRI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLOS Biol* **5**:e248.
- Cederblad B, Blomberg S, Vallin H, Perers A, Alm GV und Ronnblom L** (1998) Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha- producing cells *J Autoimmun.* **11**:465.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A und Colonna M** (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* **5**:919.
- Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, Bacheller D, Papasavvas E, Jerandi G, Mounzer K, Kostman J, Trinchieri G und Montaner LJ** (2002) Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* **168**:4796.
- Chiu CW, Dalton M, Ishiai M, Kurosaki T und Chan AC** (2002) BLNK: molecular scaffolding through 'cis'-mediated organization of signaling proteins. *EMBO J* **21**:6461.
- Collart MA, Baeuerle P und Vassalli P** (1990) Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B *Mol Cell Biol.* **10**:1498.
- Colonna M** (2007) All roads lead to CARD9. *Nat Immunol* **8**:554.
- Colonna M, Samaridis J und Angman L** (2000) Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol* **30**:697.
- Crotzer VL, Mabardy AS, Weiss A und Brodsky FM** (2004) T cell receptor engagement leads to phosphorylation of clathrin heavy chain during receptor internalization *J Exp Med.* **199**:981.

- Davis TA, Saini AA, Blair PJ, Levine BL, Craighead N, Harlan DM, June CH und Lee KP** (1998) Phorbol esters induce differentiation of human CD34+ hemopoietic progenitors to dendritic cells: Evidence for protein kinase c-mediated signaling. *J Immunol* **160**:3689.
- Der SD, Zhou A, Williams BR und Silverman RH** (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:15623.
- Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW und Schmitz J** (2000) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* **165**:6037.
- Dzionic A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Röck J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y und Schmitz J** (2002) Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* **63**:1133.
- Dzionic A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Günther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y und Schmitz J** (2001) BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* **194**:1823.
- Facchetti F, De Wolf-Peeters C, De Vos R, van den Oord JJ, Pulford KA und Desmet VJ** (1989a) Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in granulomatous lymphadenitis *Hum Pathol.* **20**:588.
- Facchetti F, de Wolf-Peeters C, van den Oord JJ, de Vos R und Desmet VJ** (1989b) Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study. *Am J Clin Pathol* **92**:42.
- Facchetti F, De Wolf-Peeters C, Van den Oord JJ und Desmet VJ** (1988) Plasmacytoid T cells in a case of lymphocytic infiltration of skin. A component of the skin-associated lymphoid tissue? *J Pathol* **155**:295.
- Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P und Jahnsen FL** (2001) Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* **159**:237.
- Feldman S, Stein D, Amrute S, Denny T, Garcia Z, Kloser P, Sun Y, Megjugorac N und Fitzgerald-Bocarsly P** (2001) Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* **101**:201.
- Feller AC, Lennert K, Stein H, Bruhn HD und Wuthe HH** (1983) Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases *Histopathology.* **7**:825.
- Fluckiger AC, Li Z, Kato RM, Wahl MI, Ochs HD, Longnecker R, Kinet JP, Witte ON, Scharenberg AM und Rawlings DJ** (1998) Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation *Embo J.* **17**:1973.

- Fong L, Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG und Engleman EG** (2002) Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* **76**:11033.
- Fuchs A, Cella M, Kondo T und Colonna M** (2005) Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood*. **106**:2076.
- Galibert L, Maliszewski CR und Vandenabeele S** (2001) Plasmacytoid monocytes/T cells: a dendritic cell lineage? *Semin Immunol* **13**:283.
- Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA und van Kooyk Y** (2004) Self- and non-self-recognition by c-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. **22**:33.
- Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, Nestle FO und Dummer R** (2004) Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch Dermatol* **140**:1490.
- Görg A, Obermaier C, Boguth C, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R und Weiss W** (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**:1037.
- Holmskov U, Thiel S und Jensenius JC** (2003) Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol*. **21**:547.
- Horejsi V, Zhang W und Schraven B** (2004) Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol*. **4**:603.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K und Akira S** (1999) Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as Lps hene product. *J Immunol* **162**:749.
- Humphrey M, Lanier LL und Nakamura H** (2005) Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunol Rev* **208**:50.
- Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W und Liu Y-J** (2006) Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. *Blood* **107**:2423.
- Janeway CA und Medzhitov R** (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**:197.
- Jego G, Palucka AK, Blanck J-P, Chalouni C, Pascual V und Banchereau J** (2003) Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**:225.
- Kanazawa N, Tashiro K, Inaba K, Lutz M und Miyachi Y** (2004) Molecular cloning of human dectin-2. *J Invest Dermatol* **122**:1522.
- Kanazawa N, Tashiro K, Inaba K und Miyachi Y** (2003) Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain. *J Biol Chem*. **278**:32645.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM und Hartmann G** (2001) Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* **31**:2154.

- Kurosaki T** (2000) Functional dissection of BCR signaling pathways. *Curr Opin Immunol* **12**:276.
- Kurosaki T** (2002) Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat Rev Immunol* **2**:354.
- Lanier LL** (2003) Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* **15**:308.
- Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP und Clark EA** (1996) Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk *Mol Cell Biol.* **16**:1305.
- Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD und Wolfe F** (1998) Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States *Arthritis Rheum.* **41**:778.
- Lemaitre B** (2004) The road to Toll *Nat Rev Immunol* **4**:521.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM und Hoffmann JA** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973.
- Lennert K und Remmele W** (1958) [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.] *Acta Haematol.* **19**:99.
- Libermann TA und Baltimore D** (1990) Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor *Mol Cell Biol.* **10**:2327.
- Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M und Steinman RM** (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments *J Cell Biol.* **151**:673.
- Marshak-Rothstein A** (2006) Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6**:823.
- Mecklenbrauker I, Saijo K, Zheng NY, Leitges M und Tarakhovsky A** (2002) Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance *Nature.* **416**:860.
- Mellor H und Parker PJ** (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* **332**:281.
- Merck E, Gaillard C, Gorman DM, Montero-Julian F, Durand I, Zurawski SM, Menetrier-Caux C, Carra G, Lebecque S, Trinchieri G und Bates EE** (2004) OSCAR is an FcRgamma-associated receptor that is expressed by myeloid cells and is involved in antigen presentation and activation of human dendritic cells *Blood.* **104**:1386.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W und Radbruch A** (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS *Cytometry.* **11**:231.
- Miyamoto A, Nakayama K, Imaki H, Hirose S, Jiang Y, Abe M, Tsukiyama T, Nagahama H, Ohno S, Hatakeyama S und Nakayama KI** (2002) Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta. *Nature* **416**:865.
- Monroe JG** (2006) ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes *Nat Rev Immunol.* **6**:283.
- Niiri H und Clark EA** (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**:945.

- O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N und Steinman RM** (1994) Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature *Immunology*. **82**:487.
- Pei Y und Tuschl T** (2006) On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* **3**:670.
- Penna G, Sozzani S und Adorini L** (2001) Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **167**:1862.
- Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S und Adorini L** (2002) Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **169**:6673.
- Perussia B, Fanning V und Trinchieri G** (1985) A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses *Nat Immun Cell Growth Regul.* **4**:120.
- Peters JD, Furlong MT, Asai DJ, Harrison ML und Geahlen RL** (1996) Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine. *J Biol Chem* **271**:4755.
- Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S und Hartmann G** (2004) Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* **103**:3058.
- Pollard TD und Borisy GG** (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**:453.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M und Galanos C** (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene *Science* **282**:2085.
- Radbruch A** (1992) *Flow cytometry and cell sorting*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ravetch JV und Lanier LL** (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* **290**:84.
- Reth M** (1989) Antigen receptors tail clue. *Nature* **338**:383.
- Rhee SG** (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C *Annu Rev Biochem.* **70**:281.
- Rhee SG und Bae YS** (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes *J Biol Chem.* **272**:15045.
- Rönnblom L und Alm GV** (2001) A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med* **194**:F59.
- Rönnblom L, Eloranta M-L und Alm GV** (2003) Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity. *Autoimmunity* **36**:463.
- Rönnblom LE, Alm GV und Oberg KE** (1990) Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient with a malignant carcinoid tumour *J Intern Med.* **227**:207.
- Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD und Comb MJ** (2005) Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells *Nat Biotechnol.* **23**:94.

- Saijo K, Mecklenbrauker I, Schmedt C und Tarakhovsky A** (2003) B cell immunity regulated by the protein kinase C family *Ann N Y Acad Sci.* **987**:125.
- Salisbury JL, Condeelis JS und Satir P** (1980) Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells *J Cell Biol.* **87**:132.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD, Jr. und Ariizumi K** (2006) Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses *J Biol Chem.* **281**:38854.
- Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA und Jongeneel CV** (1990) Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages *J Exp Med.* **171**:35.
- Shimizu H, Mitomo K, Watanabe T, Okamoto S und Yamamoto K** (1990) Involvement of a NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines *Mol Cell Biol.* **10**:561.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S und Liu YJ** (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood *Science.* **284**:1835.
- Smale ST** (2003) The establishment and maintenance of lymphocyte identity through gene silencing. *Nat Immunol.* **4**:607.
- Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S und Klagsbrun M** (2002) VEGF(165) mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF(165)-receptor binding. *J Cell Biochem* **85**:357.
- Sommer K, Guo B, Pomerantz JL, Bandaranayake AD, Moreno-Garcia ME, Ovechkina YL und Rawlings DJ** (2005) Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kB activation. *Immunity* **23**:561.
- Sontheimer EJ und Carthew R** (2005) Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* **122**:9.
- Steinman RM** (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity *Annu Rev Immunol.* **9**:271.
- Steinman RM, Hawiger D und Nussenzweig MC** (2003) Tolerogenic dendritic cells *Annu Rev Immunol.* **21**:685.
- Stoddart A, Dykstra ML, Brown BK, Song W, Pierce SK und Brodsky FM** (2002) Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization *Immunity.* **17**:451.
- Su TT, Guo B, Kawakami Y, Sommer K, Chae K, Humphries LA, Kato RM, Kang S, Patrone L, Wall R, Teitell M, Leitges M, Kawakami T und Rawlings DJ** (2002) PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling *Nat Immunol.* **3**:780.
- Svensson H, Johannisson A, Nikkila T, Alm GV und Cederblad B** (1996) The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry *Scand J Immunol.* **44**:164.
- Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD und Drickamer K** (1990) Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J Biol Chem* **265**:12156.

- Trinchieri G, Santoli D, Dee RR und Knowles BB** (1978) Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *J Exp Med* **147**:1299.
- Trinchieri G und Sher A** (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* **7**:179.
- Turner M und Billadeau DD** (2002) VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors *Nat Rev Immunol*. **2**:476.
- Vallin H, Perers A, Alm GV und Ronnblom L** (1999) Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **163**:6306.
- Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, Trinchieri G und Caux C** (2003) The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* **198**:823.
- Vascotto F, Le Roux D, Lankar D, Faure-Andre G, Vargas P, Guernonprez P und Lennon-Dumenil AM** (2007) Antigen presentation by B lymphocytes: how receptor signaling directs membrane trafficking *Curr Opin Immunol*. **19**:93.
- Watanabe D, Hashimoto S, Ishiai M, Matsushita M, Baba Y, Kishimoto T, Kurosaki T und Tsukada S** (2001) Four tyrosine residues in phospholipase C-gamma 2, identified as Btk-dependent phosphorylation sites, are required for B cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *J Biol Chem* **276**:38595.
- Weis WI, Taylor ME und Drickamer K** (1998) The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* **163**:19.
- Wintergerst E, Manz-Keinke H, Plattner H und Schlepper-Schafer J** (1989) The interaction of a lung surfactant protein (SP-A) with macrophages is mannose dependent. *Eur J Cell Biol* **50**:291.
- Xia Y, Pauza ME, Feng L und Lo D** (1997) RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation *Am J Pathol*. **151**:375.
- Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Nishiwaki T, Kitabatake M, Ueha S, Narumi S, Morikawa S, Ezaki T, Lu B, Gerard C, Ishikawa S und Matsushima K** (2004) Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* **16**:915.
- Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL und Siraganian RP** (2000) Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody *J Biol Chem*. **275**:35442.

6 Anhang

6.1 Sequenzen

6.1.1 Nukleinsäuresequenz von pRc/CMV2-BDCA-2

Angegeben sind die Schnittstellen der PfIM I und PshA I, sowie **BamH I** und **Not I** Endonukleasen.

```
GTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTAACT
GGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTCTAGTG
GATCCCACACAatggtgcctgaagaagagcctcaagaccgagagaaaggac
tctggtggttccagttgaaggtctggtccatggcagtcgtatccatcttg
ctcctcagtgctctgtttcactgtgagttctgtggtgcctcacaattttat
gtatagcaaaactgtcaagaggctgtccaagttacgagagtatcaacagt
atcatccaagcctgacctgcgtcatggaaggaaaggacatagaagattgg
agctgctgccccaaccccttggaacttcatttcagtctagttgctactttat
ttctactgggatgcaatcttggactaagagtcaaaagaactgttctgtga
tggtgggtgatctggtggtgatcaacaccagggaagaacaggatttcac
attcagaatctgaaaagaaattcttcttattttctggggctgtcagatcc
aggggggtcggcgacattggcaatgggttgaccagacaccatacaatgaaa
atgtcacattctggcactcaggtgaaccaataaccttgatgagcgttgt
gcgataataaatttccgttcttcagaagaatggggctggaatgacattca
ctgtcatgtacctcagaagtcaatttgcaagatgaagaagatctacatat
aaatgaaatattctccctggaaatgtgtttgggttggtatccaccgttgt
agaaagctaaattgatttttttaatttatgtgtaagttttgtacaaggaat
gcccctaaaatgtCTAGAGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCG
TTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT
```

6.1.2 Nukleinsäuresequenz des Klonierungsfragments CD303 mit CLEC4D-Transmembrandomäne

Angegeben sind die Schnittstellen der Endonukleasen PfIM I und PshA I.

```
PfIM I      CCACACAatggtgcctgaagaagagcctcaagaccgagag
aaaggactctggtggttccagttgaaggtctggtccattgctgtagtttt
catcttacttctcagtgctctgttttattgcaagttgtttgggtgcctcaca
attttatgtatagcaaaactgtcaagaggctgtccaagttacgagagtat
caacagtatcatccaagcctgacctgcgtc                      PshA I
```

6.1.3 Nukleinsäuresequenz des Klonierungsfragments CD303 mit CLEC4A-Transmembrandomäne

Angegeben sind die Schnittstellen der Endonukleasen PflM I und PshA I.

PflM I CCACACAatggtgcctgaagaagagcctcaagaccgagag
aaaggactctggtggttccagttgaaggtctggtcc**cctgttgatattttt**
cctgctattggcaatctcattctttattgcttttgtcattttctttcctc
acaattttatgtatagcaaaactgtcaagaggctgtccaagttacgagag
tatcaacagtatcatccaagcctgacctgcgtc PshA I

6.2 Genregulationsdaten der Microarray-Analyse

Tabelle 5: Effekt der CD303-mAk-Behandlung auf die Genregulation unstimulierter PDC nach 15 Stunden dargestellt als log2.

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CD303 (log2)
208261_x_at	interferon, alpha 10	IFNA10	-4,95
208375_at	interferon, alpha 1	IFNA1	-3,65
217345_at	survival motor neuron pseudogene		-3,37
208173_at	interferon, beta 1, fibroblast	IFNB1	-2,65
215514_at	cDNA DKFZp564M0616		-2,57
216588_at	clone 391O22 on chromosome 6p21,2-21,31		-2,55
214133_at	mucin 6, gastric	MUC6	-2,17
219285_s_at	ninein (GSK3B interacting protein)	NIN	-2,13
205450_at	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)	PHKA1	-2,10
205773_at	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3	CPEB3	-2,06
209277_at	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	-2,01
213690_s_at	DKFZP586I111 protein	DKFZP586I111	-1,98
204533_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	-1,79
208344_x_at	interferon, alpha 13	IFNA13	-1,74
211267_at	homeo box (expressed in ES cells) 1	HESX1	-1,72
215294_s_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	SMARCA1	-1,69
207133_x_at	lymphocyte alpha-kinase	LAK	-1,67
204959_at	myeloid cell nuclear differentiation antigen	MNDA	-1,66
219726_at	neuroligin 3	NLGN3	-1,53
211122_s_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	-1,46
205692_s_at	CD38 antigen (p45)	CD38	-1,45
211456_x_at	metallothionein 1 pseudogene 2	MT1P2	-1,42
210163_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	-1,41
208548_at	interferon, alpha 6	IFNA6	-1,40
217502_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	IFIT2	-1,37
206178_at	phospholipase A2, group V	PLA2G5	-1,37
216537_s_at	sialic acid binding Ig-like lectin 7	SIGLEC7	-1,34
208448_x_at	interferon, alpha 16	IFNA16	-1,29
206503_x_at	promyelocytic leukemia	PML	-1,25
214229_at	dynein, axonemal, heavy polypeptide 17	DNAH17	-1,22
204698_at	interferon stimulated gene 20kDa	ISG20	-1,19
202411_at	interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	-1,17
203153_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	-1,17
200884_at	creatine kinase, brain	CKB	-1,17
204224_s_at	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	GCH1	-1,16
218943_s_at	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	RIG-I	-1,15
201601_x_at	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	-1,14
204747_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	IFIT4	-1,14

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CD303 (log2)
	repeats 4		
201508_at	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	-1,13
214569_at	interferon, alpha 5	IFNA5	-1,09
213797_at	vipirin	cig5	-1,08
219364_at	likely ortholog of mouse D11lgp2	LGP2	-1,06
203503_s_at	peroxisomal biogenesis factor 14	PEX14	-1,05
210797_s_at	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL	-1,04
207964_x_at	interferon, alpha 4	IFNA4	-1,04
217897_at	FXYP domain containing ion transport regulator 6	FXYP6	-1,04
213716_s_at	secreted and transmembrane 1	SECTM1	-1,01
204273_at	endothelin receptor type B	EDNRB	-1,00
203281_s_at	ubiquitin-activating enzyme E1-like	UBE1L	-1,00
222074_at	uroporphyrinogen decarboxylase	UROD	-1,00
208208_at	myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle	MYH13	-1,00
208859_s_at	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (RAD54 homolog, S. cerevisiae)	ATR1	1,00
219174_at	capillary morphogenesis protein 1	CMG1	1,00
203324_s_at	caveolin 2	CAV2	1,01
219201_s_at	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	TWSG1	1,01
212291_at	homeodomain interacting protein kinase 1-like protein	Nbak2	1,02
203276_at	lamin B1	LMNB1	1,02
215123_at	KIAA0220 protein	KIAA0220	1,03
207872_s_at	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1	LILRA1	1,03
216109_at	Thyroid hormone receptor associated protein 2	THRAP2	1,04
212249_at	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	PIK3R1	1,04
218888_s_at	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	NETO2	1,04
216575_at	clone 38C16 on chromosome 6q22,33-24,1		1,04
201373_at	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	PLEC1	1,05
212417_at	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	1,12
204101_at	myotubular myopathy 1	MTM1	1,14
205856_at	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	SLC14A1	1,17
215504_x_at	clone 25061 mRNA sequence		1,18
219091_s_at	EMILIN-like protein EndoGlyx-1	ENDOGLYX1	1,20
216118_at	cDNA FLJ12365		1,20
222071_s_at	hypothetical protein PRO2176	PRO2176	1,21
208190_s_at	liver-specific bHLH-Zip transcription factor	LISCH7	1,25
205816_at	integrin, beta 8	ITGB8	1,27
217319_x_at	cytochrome P450, subfamily IVA, polypeptide 11	CYP4A11	1,28
217706_at	ESTs, Weakly similar to neuronal thread protein		1,29
81737_at	cDNA FLJ23572		1,30
215666_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	HLA-DRB4	1,37
214651_s_at	homeo box A9	HOXA9	1,39
217655_at	FXYP domain containing ion transport	FXYP5	1,49

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CD303 (log2)
	regulator 5		
216170_at	cDNA FLJ21618		1,51
214455_at	H2B histone family, member L	H2BFL	1,77
202015_x_at	methionyl aminopeptidase 2	METAP2	1,88
216722_at	VENT homeobox (Xenopus laevis)		1,98
	pseudogene 1	VENTXP1	
210661_at	glycine receptor, alpha 3	GLRA3	2,00
207272_at	zinc finger protein 80 (pT17)	ZNF80	2,02
215615_x_at	cDNA FLJ14152		2,15
214405_at	clone 23705 mRNA sequence		2,21
217085_at	cDNA DKFZp564E026		2,33
210528_at	major histocompatibility complex, class I-like sequence	HLALS	2,42
216771_at	cDNA FLJ21541		2,62
219975_x_at	oleoyl-ACP hydrolase	OLAH	2,79
214985_at	Homo sapiens clone 24739 mRNA sequence		2,79
209960_at	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	HGF	2,82
212681_at	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	EPB41L3	3,07
213610_s_at	kelch-like 23 (Drosophila)	KLHL23	3,22
207638_at	protease, serine, 7 (enterokinase)	PRSS7	3,55
210656_at	embryonic ectoderm development	EED	3,61

Tabelle 6: Effekt der CpG-Stimulation von PDC nach 15 Stunden dargestellt als log2.

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
209901_x_at	allograft inflammatory factor 1	AIF1	-4,97
207533_at	chemokine (C-C motif) ligand 1	CCL1	-4,95
215051_x_at	allograft inflammatory factor 1	AIF1	-4,94
213095_x_at	allograft inflammatory factor 1	AIF1	-4,93
215514_at	cDNA DKFZp564M0616		-4,92
221724_s_at	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 6	CLECSF6	-4,57
214450_at	cathepsin W (lymphopain)	CTSW	-4,26
215695_s_at	glycogenin 2	GYG2	-4,07
217489_s_at	interleukin 6 receptor	IL6R	-3,88
212654_at	tropomyosin 2 (beta)	TPM2	-3,58
201796_s_at	valyl-tRNA synthetase 2	VAR2	-3,38
208215_x_at	dopamine receptor D4	DRD4	-3,04
214735_at	phosphoinositide-binding protein PIP3-E	PIP3-E	-2,99
204661_at	CDW52 antigen (CAMPATH-1 antigen)	CDW52	-2,92
208146_s_at	carboxypeptidase, vitellogenic-like	CPVL	-2,87
215516_at	laminin, beta 4	LAMB4	-2,81
207220_at	Dombrock blood group	DO	-2,75
214319_at	furry homolog (Drosophila)	FRY	-2,72
204438_at	mannose receptor, C type 1	MRC1	-2,67
207425_s_at	MLL septin-like fusion	MSF	-2,62
211582_x_at	leukocyte specific transcript 1	LST1	-2,6
204083_s_at	tropomyosin 2 (beta)	TPM2	-2,53
34210_at	CDW52 antigen (CAMPATH-1 antigen)	CDW52	-2,49
213975_s_at	lysozyme (renal amyloidosis)	LYZ	-2,47
207788_s_at	vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1)	SCAM-1	-2,46
215633_x_at	leukocyte specific transcript 1	LST1	-2,45
211993_at	protein kinase, lysine deficient 1	PRKWNK1	-2,44
219947_at	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 6	CLECSF6	-2,43
221529_s_at	plasmalemma vesicle associated protein	PLVAP	-2,42
213428_s_at	collagen, type VI, alpha 1	COL6A1	-2,4
206120_at	CD33 antigen (gp67)	CD33	-2,36
205898_at	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	-2,35
215382_x_at	tryptase, alpha	TPS1	-2,35
222375_at	ESTs, Moderately similar to hypothetical protein FLJ20234		-2,35
214181_x_at	leukocyte specific transcript 1	LST1	-2,34
205856_at	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	SLC14A1	-2,32
210612_s_at	synaptojanin 2	SYNJ2	-2,32
213364_s_at	cDNA DKFZp586G1520		-2,32
211581_x_at	leukocyte specific transcript 1	LST1	-2,3

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
205051_s_at	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	KIT	-2,27
204890_s_at	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	LCK	-2,25
201425_at	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	ALDH2	-2,22
203760_s_at	Src-like-adaptor	SLA	-2,22
210139_s_at	peripheral myelin protein 22	PMP22	-2,21
202497_x_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	SLC2A3	-2,19
203264_s_at	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	ARHGEF9	-2,18
209156_s_at	collagen, type VI, alpha 2	COL6A2	-2,17
214574_x_at	leukocyte specific transcript 1	LST1	-2,17
221075_s_at	natural cytotoxicity triggering receptor 2	NCR2	-2,13
212560_at	FLJ21930		-2,13
217535_at	ESTs, Weakly similar to hypothetical protein FLJ20489		-2,13
205859_at	lymphocyte antigen 86	LY86	-2,12
204777_s_at	mal, T-cell differentiation protein	MAL	-2,11
219726_at	neuroligin 3	NLGN3	-2,1
210629_x_at	leukocyte specific transcript 1	LST1	-2,08
207434_s_at	FXVD domain containing ion transport regulator 2	FXVD2	-2,06
205293_x_at	BAI1-associated protein 2	BAIAP2	-2,04
219938_s_at	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	PSTPIP2	-2,01
210140_at	cystatin F (leukocystatin)	CST7	-2
213566_at	ribonuclease, RNase A family, k6	RNASE6	-1,99
205674_x_at	FXVD domain containing ion transport regulator 2	FXVD2	-1,97
204891_s_at	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	LCK	-1,96
202152_x_at	upstream transcription factor 2, c-fos interacting	USF2	-1,95
202295_s_at	cathepsin H	CTSH	-1,92
206932_at	cholesterol 25-hydroxylase	CH25H	-1,92
211334_at	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)	MRE11A	-1,92
218800_at	steroid 5 alpha-reductase 2-like	SRD5A2L	-1,92
201167_x_at	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDIA	-1,91
220066_at	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2	NOD2	-1,91
208208_at	myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle	MYH13	-1,9
202803_s_at	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), lymphocyte function-associated antigen 1; macrophage antigen 1 (mac-1) beta subunit)	ITGB2	-1,89
204072_s_at	furry homolog (Drosophila)	FRY	-1,89
201666_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)	TIMP1	-1,87
203989_x_at	coagulation factor II (thrombin) receptor	F2R	-1,87
206698_at	Kell blood group precursor (McLeod phenotype)	XK	-1,86
201141_at	glycoprotein (transmembrane) nmb	GPMB	-1,84

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
205067_at	interleukin 1, beta	IL1B	-1,83
214058_at	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1	MYCL1	-1,83
219806_s_at	FN5 protein	FN5	-1,83
219505_at	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1	CECR1	-1,82
205484_at	SHP2 interacting transmembrane adaptor	SIT	-1,81
211796_s_at	T cell receptor beta locus	TRB	-1,81
204446_s_at	arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	-1,78
213920_at	cut-like 2 (Drosophila)	CUTL2	-1,78
214133_at	mucin 6, gastric	MUC6	-1,78
210136_at	myelin basic protein	MBP	-1,78
205418_at	feline sarcoma oncogene	FES	-1,77
208018_s_at	hemopoietic cell kinase	HCK	-1,77
201280_s_at	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2	-1,75
203104_at	colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog	CSF1R	-1,75
210347_s_at	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	BCL11A	-1,75
218084_x_at	FXD domain containing ion transport regulator 5	FXD5	-1,75
206983_at	chemokine (C-C motif) receptor 6	CCR6	-1,75
213606_s_at	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI	-1,74
209982_s_at	neurexin 2	NRXN2	-1,73
206762_at	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	KCNA5	-1,73
1316_at	thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog, avian)	THRA	-1,72
201506_at	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	TGFB1	-1,72
217685_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	SLC16A3	-1,71
213280_at	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 4	GARNL4	-1,71
203186_s_at	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)	S100A4	-1,7
221059_s_at	coactosin-like 1 (Dictyostelium)	COTL1	-1,7
203126_at	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	IMPA2	-1,67
220974_x_at	sideroflexin 3	SFXN3	-1,67
204529_s_at	thymus high mobility group box protein TOX	TOX	-1,66
209301_at	carbonic anhydrase II	CA2	-1,66
211178_s_at	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1	PSTPIP1	-1,66
214765_s_at	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	ASAHL	-1,66
213072_at	cysteine/histidine-rich 1	CYHR1	-1,66
204249_s_at	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	LMO2	-1,65
209519_at	nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa	NCBP1	-1,64

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
203932_at	major histocompatibility complex, class II, DM beta	HLA-DMB	-1,63
206470_at	plexin C1	PLXNC1	-1,63
210830_s_at	paraoxonase 2	PON2	-1,63
203780_at	epithelial V-like antigen 1	EVA1	-1,62
221815_at	abhydrolase domain containing 2	ABHD2	-1,62
206181_at	signaling lymphocytic activation molecule	SLAM	-1,61
213830_at	T cell receptor delta locus	TRD	-1,61
204445_s_at	arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	-1,6
205456_at	CD3E antigen, epsilon polypeptide (TiT3 complex)	CD3E	-1,6
213316_at	cDNA DKFZp586L0120		-1,6
201005_at	CD9 antigen (p24)	CD9	-1,59
220663_at	interleukin 1 receptor accessory protein-like 1	IL1RAPL1	-1,58
217655_at	FXVD domain containing ion transport regulator 5	FXVD5	-1,58
219165_at	PDZ and LIM domain 2 (mystique)	PDLIM2	-1,57
204247_s_at	cyclin-dependent kinase 5	CDK5	-1,56
216180_s_at	synaptojanin 2	SYNJ2	-1,55
214339_s_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP4K1	-1,54
210461_s_at	actin binding LIM protein 1	ABLIM1	-1,53
214366_s_at	arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	-1,53
217493_x_at	natural cytotoxicity triggering receptor 2	NCR2	-1,53
201278_at	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein	DAB2	-1,53
210778_s_at	MAX dimerization protein 4	MXD4	-1,52
214500_at	H2A histone family, member Y	H2AFY	-1,52
221974_at	imprinted in Prader-Willi syndrome	IPW	-1,52
208760_at	Ubiquitin-conjugating enzyme E21 (UBC9 homolog, yeast)	UBE2I	-1,52
219497_s_at	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	BCL11A	-1,51
204037_at	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	EDG2	-1,5
207957_s_at	protein kinase C, beta 1	PRKCB1	-1,5
211141_s_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	CNOT3	-1,5
200696_s_at	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	GSN	-1,49
203140_at	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	BCL6	-1,49
203509_at	sortilin-related receptor, L (DLR class) A repeats-containing	SORL1	-1,49
208820_at	PTK2 protein tyrosine kinase 2	PTK2	-1,49
211199_s_at	B7-like protein	B7H2	-1,49
216144_at	cDNA DKFZp434K1126		-1,49
205312_at	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1	SPI1	-1,48
206296_x_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP4K1	-1,48
205945_at	interleukin 6 receptor	IL6R	-1,48
201036_s_at	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase,	HADHSC	-1,48

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
	short chain		
206100_at	carboxypeptidase M	CPM	-1,47
214866_at	plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	-1,47
201876_at	paraoxonase 2	PON2	-1,46
210202_s_at	bridging integrator 1	BIN1	-1,46
219463_at	chromosome 20 open reading frame 103	C20orf103	-1,46
221269_s_at	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	SH3BGRL3	-1,46
206042_x_at	SNRPN upstream reading frame	SNURF	-1,46
204163_at	elastin microfibril interface located protein	EMILIN	-1,46
203388_at	arrestin, beta 2	ARRB2	-1,45
209827_s_at	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	IL16	-1,45
201040_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2	GNAI2	-1,44
212144_at	unc-84 homolog A (C. elegans)	UNC84B	-1,44
204718_at	EphB6	EPHB6	-1,44
212047_s_at	DKFZP566H073 protein	DKFZP566H073	-1,44
202813_at	TAR (HIV) RNA binding protein 1	TARBP1	-1,43
205611_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	TNFSF12	-1,43
211668_s_at	plasminogen activator, urokinase	PLAU	-1,43
219498_s_at	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	BCL11A	-1,43
217914_at	two-pore channel 1, homolog	KIAA1169	-1,43
203976_s_at	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	CHAF1A	-1,42
214426_x_at	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	CHAF1A	-1,42
215538_at	like-glycosyltransferase	LARGE	-1,42
209685_s_at	protein kinase C, beta 1	PRKCB1	-1,41
214219_x_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAP4K1	-1,41
216488_s_at	ATPase, Class VI, type 11A	ATP11A	-1,41
212192_at	hypothetical protein BC013764	LOC115207	-1,41
217983_s_at	ribonuclease 6 precursor	RNASE6PL	-1,41
218017_s_at	hypothetical protein FLJ22242	FLJ22242	-1,41
201279_s_at	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2	-1,4
214040_s_at	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	GSN	-1,4
216641_s_at	ladinin 1	LAD1	-1,4
204759_at	chromosome condensation 1-like	CHC1L	-1,4
208873_s_at	likely ortholog of mouse deleted in polyposis 1	DP1	-1,4
212574_x_at	hypothetical protein MGC4022	R32184_3	-1,4
213968_at	tetraspan 5	TM4SF9	-1,4
218983_at	complement C1r-like proteinase precursor,	LOC51279	-1,4
201288_at	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	ARHGDIB	-1,39
204960_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein	PTPRCAP	-1,39
214228_x_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	TNFRSF4	-1,39

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
221658_s_at	interleukin 21 receptor	IL21R	-1,39
213093_at	cDNA FLJ30869		-1,39
218094_s_at	chromosome 20 open reading frame 35	C20orf35	-1,39
205294_at	BAI1-associated protein 2	BAIAP2	-1,38
209496_at	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	RARRES2	-1,38
208657_s_at	MLL septin-like fusion	MSF	-1,38
217984_at	ribonuclease 6 precursor	RNASE6PL	-1,38
221666_s_at	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	ASC	-1,38
219666_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	MS4A6A	-1,37
209179_s_at	leukocyte receptor cluster (LRC) member 4	LENG4	-1,37
210279_at	G protein-coupled receptor 18	GPR18	-1,37
217045_x_at	natural cytotoxicity triggering receptor 2	NCR2	-1,37
212706_at	Ca ²⁺ -promoted Ras inactivator	CAPRI	-1,37
217513_at	Unknown protein for MGC:11120		-1,37
212384_at	HLA-B associated transcript 1	BAT1	-1,36
218421_at	ceramide kinase	CERK	-1,36
219032_x_at	opsin 3 (encephalopsin, panopsin)	OPN3	-1,35
39729_at	peroxiredoxin 2	PRDX2	-1,35
218608_at	ATPase type 13A2	ATP13A2	-1,35
210757_x_at	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2	-1,34
211924_s_at	plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	-1,34
217119_s_at	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	CXCR3	-1,34
210792_x_at	CD27-binding (Siva) protein	SIVA	-1,34
217695_x_at	ESTs, Weakly similar to hypothetical protein FLJ20489		-1,34
49111_at	cDNA DKFZp762M127		-1,34
220727_at	potassium channel, subfamily K, member 10	KCNK10	-1,33
203795_s_at	B-cell CLL/lymphoma 7A	BCL7A	-1,32
209502_s_at	BAI1-associated protein 2	BAIAP2	-1,32
215925_s_at	CD72 antigen	CD72	-1,32
203923_s_at	cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	CYBB	-1,31
204334_at	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	KLF7	-1,31
207794_at	chemokine (C-C motif) receptor 2	CCR2	-1,31
201720_s_at	Lysosomal-associated multispinning membrane protein-5	LAPTM5	-1,3
201373_at	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	PLEC1	-1,29
204485_s_at	target of myb1-like 1 (chicken)	TOM1L1	-1,29
207164_s_at	zinc finger protein 238	ZNF238	-1,29
211676_s_at	interferon gamma receptor 1	IFNGR1	-1,29
221491_x_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	HLA-DRB5	-1,29
209480_at	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	HLA-DQB1	-1,28

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
212170_at	RNA binding motif protein 12	RBM12	-1,28
214558_at	G protein-coupled receptor 12	GPR12	-1,28
217931_at	trinucleotide repeat containing 5	TNRC5	-1,28
221321_s_at	Kv channel interacting protein 2	KCNIP2	-1,28
207839_s_at	NAG-5 protein	LOC51754	-1,28
208534_s_at	Ca ²⁺ -promoted Ras inactivator	CAPRI	-1,28
213241_at	plexin C1	PLXNC1	-1,28
203499_at	EphA2	EPHA2	-1,27
204232_at	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	FCER1G	-1,27
204401_at	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4	KCNN4	-1,26
216971_s_at	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	PLEC1	-1,26
217078_s_at	CD300a molecule	CD300A	-1,26
39582_at	cylindromatosis (turban tumor syndrome)	CYLD	-1,26
211249_at	G protein-coupled receptor 68	GPR68	-1,25
202534_x_at	dihydrofolate reductase	DHFR	-1,25
205479_s_at	plasminogen activator, urokinase	PLAU	-1,25
204233_s_at	choline kinase	CHK	-1,25
212912_at	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2	RPS6KA2	-1,25
208637_x_at	actinin, alpha 1	ACTN1	-1,24
204135_at	downregulated in ovarian cancer 1	DOC1	-1,24
210972_x_at	T cell receptor alpha locus	TRA	-1,24
213826_s_at	H3 histone, family 3A	H3F3A	-1,24
219265_at	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)	MOBK12B	-1,24
200766_at	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	CTSD	-1,23
206502_s_at	insulinoma-associated 1	INSM1	-1,23
203066_at	B cell RAG associated protein	GALNAC4S-6ST	-1,23
208010_s_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	PTPN22	-1,23
209166_s_at	mannosidase, alpha, class 2B, member 1	MAN2B1	-1,23
203799_at	C-type lectin BIMLEC precursor	BIMLEC	-1,23
218589_at	purinergic receptor (family A group 5)	P2Y5	-1,23
203402_at	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	KCNAB2	-1,22
205147_x_at	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	NCF4	-1,22
221840_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E	PTPRE	-1,22
214719_at	solute carrier family 46, member 3	SLC46A3	-1,22
65630_at	transmembrane protein 80	TMEM80	-1,22
201820_at	keratin 5	KRT5	-1,21
202740_at	aminoacylase 1	ACY1	-1,21
203331_s_at	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa	INPP5D	-1,21
206978_at	chemokine (C-C motif) receptor 2	CCR2	-1,21
208299_at	calcium channel, voltage-dependent, alpha 1	CACNA1I	-1,21

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
201328_at	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	ETS2	-1,21
206584_at	MD-2 protein	MD-2	-1,21
203252_at	tumor suppressor deleted in oral cancer-related 1	DOC-1R	-1,21
213848_at	cDNA DKFZp586F2224		-1,21
217143_s_at	T cell receptor delta locus	TRD	-1,21
203967_at	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	CDC6	-1,2
211340_s_at	melanoma cell adhesion molecule	MCAM	-1,2
215001_s_at	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	GLUL	-1,2
218856_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	TNFRSF21	-1,2
201522_x_at	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	SNRPN	-1,2
208858_s_at	likely ortholog of mouse membrane bound C2 domain containing protein	MBC2	-1,2
200648_s_at	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	GLUL	-1,19
202449_s_at	retinoid X receptor, alpha	RXRA	-1,19
204122_at	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP	-1,19
203501_at	plasma glutamate carboxypeptidase	PGCP	-1,19
206471_s_at	plexin C1	PLXNC1	-1,19
215813_s_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	PTGS1	-1,19
216905_s_at	suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma, matriptase, epithin)	ST14	-1,19
213986_s_at	hypothetical protein MGC4022	R32184_3	-1,19
202944_at	N-acetylgalactosaminidase, alpha-	NAGA	-1,18
210653_s_at	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide (maple syrup urine disease)	BCKDHB	-1,18
220023_at	apolipoprotein B48 receptor	APOB48R	-1,18
40562_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA11	-1,18
204730_at	KIAA0237 gene product	KIAA0237	-1,18
205926_at	interleukin 27 receptor, alpha	IL27RA	-1,18
200935_at	calreticulin	CALR	-1,17
202801_at	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha	PRKACA	-1,17
203865_s_at	adenosine deaminase, RNA-specific, B1 (RED1 homolog rat)	ADARB1	-1,17
212999_x_at	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	HLA-DQB1	-1,17
218798_at	hypothetical protein FLJ12949	FLJ12949	-1,17
204040_at	ring finger protein 144	RNF144	-1,17
210314_x_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	TNFSF13	-1,17
221187_s_at	hypothetical protein FLJ22688	FLJ22688	-1,17
201536_at	dual specificity phosphatase 3 (vaccinia virus phosphatase VH1-related)	DUSP3	-1,16
202589_at	thymidylate synthetase	TYMS	-1,16

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
207057_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7	SLC16A7	-1,16
208983_s_at	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	PECAM1	-1,16
211837_s_at	pre-T-cell receptor alpha precursor	PTCRA	-1,16
213737_x_at	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8G	GOLGA8G	-1,16
221581_s_at	Williams-Beuren syndrome chromosome region 5	WBSCR5	-1,16
211521_s_at	pleckstrin homology, Sec7 and coiled/coiled domains 4	PSCD4	-1,15
202426_s_at	retinoid X receptor, alpha	RXRA	-1,15
204632_at	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	RPS6KA4	-1,15
204867_at	GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein	GCHFR	-1,15
219994_at	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein	APBB1IP	-1,15
34478_at	RAB11B, member RAS oncogene family	RAB11B	-1,15
217992_s_at	EF-hand domain family, member D2	EFHD2	-1,15
203585_at	zinc finger protein 185 (LIM domain)	ZNF185	-1,14
212336_at	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	EPB41L1	-1,14
214259_s_at	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)	AKR7A2	-1,14
207735_at	ring finger protein 125	RNF125	-1,14
213542_at	zinc finger protein 710	ZNF710	-1,14
215756_at	Hypothetical protein LOC730227	LOC730227	-1,14
221778_at	jumonji C domain-containing histone demethylase 1 homolog D (S. cerevisiae)	JHDM1D	-1,14
214369_s_at	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)	RASGRP2	-1,13
215295_at	dystrobrevin, beta	DTNB	-1,13
218559_s_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	MAFB	-1,13
209933_s_at	CD300a molecule	CD300A	-1,13
204168_at	microsomal glutathione S-transferase 2	MGST2	-1,12
208454_s_at	plasma glutamate carboxypeptidase	PGCP	-1,12
209995_s_at	T-cell leukemia/lymphoma 1A	TCL1A	-1,12
212017_at	p20	LOC130074	-1,12
217520_x_at	Hypothetical LOC646278	LOC646278	-1,12
221679_s_at	abhydrolase domain containing 6	ABHD6	-1,12
202773_s_at	splicing factor, arginine/serine-rich 8 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	SFRS8	-1,11
202822_at	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	LPP	-1,11
204580_at	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	MMP12	-1,11
213552_at	likely homolog of mouse glucuronyl C5-epimerase	GLCE	-1,11
211902_x_at	T cell receptor alpha locus	TRA	-1,11
217226_s_at	sideroflexin 3	SFXN3	-1,11

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
201367_s_at	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	ZFP36L2	-1,1
219577_s_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	ABCA7	-1,1
203761_at	Src-like-adaptor	SLA	-1,1
204319_s_at	regulator of G-protein signalling 10	RGS10	-1,1
207992_s_at	adenosine monophosphate deaminase (isoform E)	AMPD3	-1,1
210162_s_at	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	-1,1
220451_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 7 (livin)	BIRC7	-1,1
202481_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	DHRS3	-1,1
203445_s_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2	CTDSP2	-1,1
213193_x_at	Interleukin 23, alpha subunit p19	IL23A	-1,1
221892_at	hexose-6-phosphate dehydrogenase	H6PD	-1,1
201350_at	flotillin 2	FLOT2	-1,09
202996_at	polymerase (DNA-directed), delta 4	POLD4	-1,09
205831_at	CD2 antigen (p50), sheep red blood cell receptor	CD2	-1,09
206001_at	neuropeptide Y	NPY	-1,09
216248_s_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	-1,09
219371_s_at	Kruppel-like factor 2 (lung)	KLF2	-1,09
209499_x_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	TNFSF13	-1,09
210915_x_at	T cell receptor beta locus	TRB	-1,09
219869_s_at	BCG-induced gene in monocytes, clone 103	BIGM103	-1,09
201401_s_at	adrenergic, beta, receptor kinase 1	ADRBK1	-1,08
201605_x_at	calponin 2	CNN2	-1,08
201935_s_at	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	EIF4G3	-1,08
202139_at	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)	AKR7A2	-1,08
204036_at	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	EDG2	-1,08
206255_at	B lymphoid tyrosine kinase	BLK	-1,08
209193_at	pim-1 oncogene	PIM1	-1,08
211105_s_at	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	-1,08
213221_s_at	KIAA0781 protein	KIAA0781	-1,08
38037_at	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	DTR	-1,08
203716_s_at	dipeptidylpeptidase IV (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	DPP4	-1,07
206313_at	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	HLA-DOA	-1,07
217269_s_at	protease, serine, 7 (enterokinase)	PRSS7	-1,07
39318_at	T-cell leukemia/lymphoma 1A	TCL1A	-1,07
201259_s_at	synaptophysin-like protein	SYPL	-1,07

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
211569_s_at	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	HADHSC	-1,07
206782_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	DNAJC4	-1,06
209201_x_at	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	CXCR4	-1,06
211478_s_at	dipeptidylpeptidase IV (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	DPP4	-1,06
214054_at	docking protein 2, 56kDa	DOK2	-1,06
214879_x_at	upstream transcription factor 2, c-fos interacting	USF2	-1,06
205708_s_at	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2	TRPM2	-1,06
211422_at	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3	TRPM3	-1,06
211495_x_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	TNFSF13	-1,06
219256_s_at	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	SH3TC1	-1,06
201721_s_at	Lysosomal-associated multispinning membrane protein-5	LAPTM5	-1,05
201936_s_at	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	EIF4G3	-1,05
206687_s_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	PTPN6	-1,05
209468_at	low density lipoprotein receptor-related protein 5	LRP5	-1,05
214581_x_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	TNFRSF21	-1,05
209034_at	proline rich 2	PROL2	-1,05
209456_s_at	F-box and WD-40 domain protein 1B	FBXW1B	-1,05
213346_at	chromosome 13 open reading frame 27	C13orf27	-1,05
221552_at	abhydrolase domain containing 6	ABHD6	-1,05
203290_at	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	HLA-DQA1	-1,04
204030_s_at	schwannomin interacting protein 1	SCHIP1	-1,04
204236_at	Friend leukemia virus integration 1	FLI1	-1,04
206618_at	interleukin 18 receptor 1	IL18R1	-1,04
208703_s_at	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	APLP2	-1,04
212998_x_at	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	HLA-DQB1	-1,04
39402_at	interleukin 1, beta	IL1B	-1,04
206309_at	chondromodulin I precursor	CHM-I	-1,04
213388_at	similar to phosphodiesterase 4D interacting protein isoform 2	LOC727942	-1,04
213638_at	phosphatase and actin regulator 1	PHACTR1	-1,04
214949_at	CDNA FLJ31919, clone NT2RP7004964	---	-1,04
217286_s_at	NDRG family member 3	NDRG3	-1,04
222037_at	minichromosome maintenance complex component 4	MCM4	-1,04
222088_s_at	glucose transporter 14	SCL2A14	-1,04
200617_at	KIAA0152 gene product	KIAA0152	-1,03
201920_at	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	SLC20A1	-1,03

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
202247_s_at	metastasis associated 1	MTA1	-1,03
210753_s_at	EphB1	EPHB1	-1,03
202464_s_at	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3	-1,03
203717_at	dipeptidylpeptidase IV (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	DPP4	-1,03
204735_at	phosphodiesterase 4A, cAMP-specific (phosphodiesterase E2 dunce homolog, Drosophila)	PDE4A	-1,03
205786_s_at	integrin, alpha M (complement component receptor 3, alpha; also known as CD11b (p170), macrophage antigen alpha polypeptide)	ITGAM	-1,03
207996_s_at	chromosome 18 open reading frame 1	C18orf1	-1,03
208438_s_at	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	FGR	-1,03
210613_s_at	synaptogyrin 1	SYNGR1	-1,03
210845_s_at	plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	-1,03
212315_s_at	nucleoporin 210	NUP210	-1,03
220386_s_at	echinoderm microtubule associated protein like 4	EML4	-1,03
208472_at	IKAROS family zinc finger 4 (Eos)	IKZF4	-1,03
212956_at	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)	TBC1D9	-1,03
217118_s_at	chromosome 22 open reading frame 9	C22orf9	-1,03
222079_at	ESTs		-1,03
203633_at	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	CPT1A	-1,02
204470_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	CXCL1	-1,02
204174_at	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	ALOX5AP	-1,02
205233_s_at	platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa	PAFAH2	-1,02
205285_s_at	FYN binding protein (FYB-120/130)	FYB	-1,02
208890_s_at	plexin B2	PLXNB2	-1,02
209555_s_at	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	CD36	-1,02
213042_s_at	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	ATP2A3	-1,02
214439_x_at	bridging integrator 1	BIN1	-1,02
219076_s_at	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa	PXMP2	-1,02
39248_at	aquaporin 3	AQP3	-1,02
209500_x_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	TNFSF13	-1,02
201163_s_at	insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	-1,01
207677_s_at	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	NCF4	-1,01
215152_at	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	MYB	-1,01
215933_s_at	hematopoietically expressed homeobox	HHEX	-1,01
217419_x_at	agrin	AGRN	-1,01
211066_x_at	protocadherin gamma subfamily C, 3	PCDHGC3	-1,01
212605_s_at	Homo sapiens clone 23872 mRNA sequence		-1,01
201292_at	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	TOP2A	-1

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
203751_x_at	jun D proto-oncogene	JUND	-1
205610_at	myomesin 1 (skelemin) 185kDa	MYOM1	-1
205798_at	interleukin 7 receptor	IL7R	-1
212757_s_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma	CAMK2G	-1
204034_at	ethylmalonic encephalopathy 1	ETHE1	-1
205101_at	MHC class II transactivator	MHC2TA	-1
212443_at	neurobeachin-like 2	NBEAL2	-1
212608_s_at	Homo sapiens clone 23872 mRNA sequence		-1
212856_at	death-inducing-protein	DIP	-1
213170_at	glutathione peroxidase 6	GPX6	-1
218358_at	cysteine-rich with EGF-like domains 2	CRELD2	-1
220999_s_at	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	CYFIP2	-1
221551_x_at	sialyltransferase 7D	SIAT7D	-1
48106_at	hypothetical protein FLJ20489	FLJ20489	0,99
209803_s_at	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	PHLDA2	0,99
219352_at	hect domain and RLD 6	HERC6	0,99
220855_at	PRO0456 protein	PRO0456	0,99
205992_s_at	interleukin 15	IL15	1
214723_x_at	KIAA1641 protein	KIAA1641	1
217192_s_at	PR domain containing 1, with ZNF domain	PRDM1	1
221485_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 5	B4GALT5	1
212569_at	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	SMCHD1	1
214023_x_at	tubulin, beta polypeptide	TUBB	1
205552_s_at	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	OAS1	1,01
218602_s_at	family with sequence similarity 29, member A	FAM29A	1,01
203708_at	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, Drosophila)	PDE4B	1,02
209906_at	complement component 3a receptor 1	C3AR1	1,02
218204_s_at	FYVE and coiled-coil domain containing 1	FYCO1	1,02
200764_s_at	catenin, alpha 1, 102kDa	CTNNA1	1,02
202708_s_at	histone cluster 2, H2be	HIST2H2BE	1,02
31845_at	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)	ELF4	1,03
202760_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein 2	AKAP2	1,03
205061_s_at	exosome component 9	EXOSC9	1,03
214681_at	glycerol kinase	GK	1,03
207098_s_at	mitofusin 1	MFN1	1,04
214620_x_at	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	PAM	1,04
206925_at	sialyltransferase 8D (alpha-2, 8-polysialyltransferase)	SIAT8D	1,04
212855_at	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (S. cerevisiae)	DCUN1D4	1,04
215220_s_at	translocated promoter region	TPR	1,04

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
204720_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	DNAJC6	1,05
220146_at	toll-like receptor 7	TLR7	1,05
212573_at	endonuclease domain containing 1	ENDOD1	1,05
213191_at	TIR domain containing adaptor inducing interferon-beta	TRIF	1,05
214657_s_at	Orf1, mRNA sequence		1,05
215504_x_at	Homo sapiens clone 25061 mRNA sequence		1,05
201995_at	exostoses (multiple) 1	EXT1	1,06
205686_s_at	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	CD86	1,06
209795_at	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	CD69	1,06
213226_at	cyclin A2	CCNA2	1,06
218927_s_at	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12	CHST12	1,06
219211_at	ubiquitin specific protease 18	USP18	1,06
221286_s_at	proapoptotic caspase adaptor protein	PACAP	1,06
209501_at	cerebellar degeneration-related protein 2, 62kDa	CDR2	1,07
201963_at	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	ACSL1	1,07
204049_s_at	phosphatase and actin regulator 2	PHACTR2	1,07
218397_at	Fanconi anemia, complementation group L	FANCL	1,07
222154_s_at	viral DNA polymerase-transactivated protein 6	LOC26010	1,07
204420_at	FOS-like antigen 1	FOSL1	1,08
220358_at	Jun dimerization protein p21SNFT	SNFT	1,08
213271_s_at	KIAA1117 protein	KIAA1117	1,08
221641_s_at	acyl-CoA thioesterase 9	ACOT9	1,08
210007_s_at	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)	GPD2	1,09
202125_s_at	trafficking protein, kinesin binding 2	TRAK2	1,09
215966_x_at	glycerol kinase	GK	1,09
218943_s_at	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	RIG-I	1,09
202687_s_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	1,1
207181_s_at	caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	CASP7	1,1
207426_s_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa)	TNFSF4	1,1
214056_at	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	1,1
210875_s_at	zinc finger E-box binding homeobox 1	ZEB1	1,1
213469_at	GPI deacylase	PGAP1	1,1
219326_s_at	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2	B3GNT2	1,1
201750_s_at	endothelin converting enzyme 1	ECE1	1,11
209304_x_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	1,11
217787_s_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	GALNT2	1,11
208925_at	claudin domain containing 1	CLDN1	1,11

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
40612_at	dopey family member 1	DOPEY1	1,11
206341_at	interleukin 2 receptor, alpha	IL2RA	1,12
212527_at	DNA segment, Chr 15, Wayne State University 75, expressed	D15Wsu75e	1,12
210070_s_at	choline kinase beta	CHKB	1,12
220089_at	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	L2HGDH	1,12
204562_at	interferon regulatory factor 4	IRF4	1,13
213797_at	vipirin	cig5	1,13
202411_at	interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	1,14
215977_x_at	glycerol kinase	GK	1,14
201999_s_at	dynein, light chain, Tctex-type 1	DYNLT1	1,14
202124_s_at	trafficking protein, kinesin binding 2	TRAK2	1,14
221212_x_at	polybromo 1	PB1	1,14
218197_s_at	oxidation resistance 1	OXR1	1,15
220941_s_at	chromosome 21 open reading frame 91	C21orf91	1,15
218999_at	transmembrane protein 140	TMEM140	1,15
204790_at	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 7	MADH7	1,16
222282_at	ESTs		1,16
202763_at	caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CASP3	1,17
204271_s_at	endothelin receptor type B	EDNRB	1,17
207387_s_at	glycerol kinase	GK	1,17
222316_at	ESTs		1,17
209546_s_at	apolipoprotein L, 1	APOL1	1,18
211085_s_at	serine/threonine kinase 4	STK4	1,19
218217_at	likely homolog of rat and mouse retinoid-inducible serine carboxypeptidase	RISC	1,19
219551_at	uncharacterized bone marrow protein BM040	TRAITS	1,19
202672_s_at	activating transcription factor 3	ATF3	1,2
203276_at	lamin B1	LMNB1	1,2
210448_s_at	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	P2RX5	1,2
209398_at	H1 histone family, member 2	H1F2	1,2
214290_s_at	H2A histone family, member O	H2AFO	1,2
203771_s_at	biliverdin reductase A	BLVRA	1,21
221203_s_at	hypothetical protein FLJ10201	FLJ10201	1,21
200798_x_at	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	1,22
202934_at	hexokinase 2	HK2	1,22
211864_s_at	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	FER1L3	1,22
213329_at	formin binding protein 2	FNBP2	1,22
202466_at	polymerase (DNA directed) sigma	POLS	1,23
207793_s_at	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked)	EPB41	1,23
210844_x_at	melanoma antigen, family D, 1	MAGED1	1,23
209959_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NR4A3	1,24
206233_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-	B4GALT6	1,24

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
	galactosyltransferase, polypeptide 6		
212334_at	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)	GNS	1,24
214651_s_at	homeo box A9	HOXA9	1,24
201466_s_at	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN	1,25
202581_at	heat shock 70kDa protein 1B	HSPA1B	1,25
203143_s_at	KIAA0040 gene product	KIAA0040	1,25
218501_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	ARHGEF3	1,25
216771_at	cDNA: FLJ21541		1,25
215910_s_at	KIAA0970 protein	KIAA0970	1,25
219863_at	cyclin-E binding protein 1	CEB1	1,25
201798_s_at	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	FER1L3	1,26
204642_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	1,27
215071_s_at	H2A histone family, member L	H2AFL	1,27
214084_x_at	neutrophil cytosolic factor 1 (47kD, chronic granulomatous disease, autosomal 1)		1,28
203680_at	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	PRKAR2B	1,29
209340_at	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	UAP1	1,29
221085_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	TNFSF15	1,29
215314_at	cDNA FLJ10270		1,29
221425_s_at	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog (S. cerevisiae)	ISCA1	1,29
207375_s_at	interleukin 15 receptor, alpha	IL15RA	1,3
218319_at	pellino homolog 1 (Drosophila)	PELI1	1,3
205114_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3	1,3
214615_at	putative purinergic receptor	P2Y10	1,3
205921_s_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	SLC6A6	1,31
217164_at	cDNA FLJ14046		1,31
32541_at	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform (calcineurin A gamma)	PPP3CC	1,32
213192_at	THAP domain containing, apoptosis associated protein 3	THAP3	1,32
216575_at	DNA sequence from clone 38C16		1,32
206298_at	Rho GTPase activating protein 22	ARHGAP22	1,33
211269_s_at	interleukin 2 receptor, alpha	IL2RA	1,34
207078_at	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 6 homolog (yeast)	MED6	1,35
204388_s_at	monoamine oxidase A	MAOA	1,37
205901_at	prepronociceptin	PNOC	1,38
207978_s_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	NR4A3	1,38
200629_at	tryptophanyl-tRNA synthetase	WARS	1,42
200796_s_at	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	1,42

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
210072_at	chemokine (C-C motif) ligand 19	CCL19	1,42
204224_s_at	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	GCH1	1,43
211267_at	homeo box (expressed in ES cells) 1	HESX1	1,43
202393_s_at	Kruppel-like factor 10	KLF10	1,43
213267_at	dopey family member 1	DOPEY1	1,43
216722_at	VENT homeobox (Xenopus laevis) pseudogene 1	VENTXP1	1,43
203153_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	1,44
208368_s_at	breast cancer 2, early onset	BRCA2	1,44
210873_x_at	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	APOBEC3A	1,44
214637_at	oncostatin M	OSM	1,45
219895_at	family with sequence similarity 70, member A	FAM70A	1,45
202043_s_at	spermine synthase	SMS	1,46
204273_at	endothelin receptor type B	EDNRB	1,46
205632_s_at	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	PIP5K1B	1,46
210190_at	syntaxin 11	STX11	1,46
218417_s_at	hypothetical protein FLJ20489	FLJ20489	1,46
213497_at	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	ABTB2	1,46
203874_s_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	SMARCA1	1,47
205226_at	platelet-derived growth factor receptor-like	PDGFRL	1,47
206486_at	lymphocyte-activation gene 3	LAG3	1,47
203810_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	DNAJB4	1,48
81737_at	cDNA: FLJ23572		1,48
203946_s_at	arginase, type II	ARG2	1,49
205207_at	interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	1,49
207574_s_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	1,5
213134_x_at	BTG family, member 3	BTG3	1,5
204747_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	IFIT4	1,5
217167_x_at	glycerol kinase	GK	1,51
204959_at	myeloid cell nuclear differentiation antigen	MNDA	1,53
217502_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	IFIT2	1,53
217319_x_at	cytochrome P450, subfamily IVA, polypeptide 11	CYP4A11	1,53
202336_s_at	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	PAM	1,55
203811_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	DNAJB4	1,55
206857_s_at	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa	FKBP1B	1,55
218888_s_at	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	NETO2	1,55
202599_s_at	nuclear receptor interacting protein 1	NRIP1	1,56
209273_s_at	hypothetical protein MGC4276 similar to CG8198	MGC4276	1,56

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
200884_at	creatine kinase, brain	CKB	1,57
204286_s_at	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	PMAIP1	1,57
204141_at	tubulin, beta polypeptide	TUBB	1,57
217085_at	cDNA DKFZp564E026		1,57
202269_x_at	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	GBP1	1,59
209274_s_at	hypothetical protein MGC4276 similar to CG8198	MGC4276	1,59
220656_at	hypothetical protein PRO2435	PRO2435	1,61
203397_s_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	GALNT3	1,63
219201_s_at	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	TWSG1	1,63
205773_at	KIAA0940 protein	KIAA0940	1,63
220118_at	testis zinc finger protein	TZFP	1,64
210797_s_at	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL	1,66
215615_x_at	cDNA FLJ14152		1,66
202684_s_at	RNA (guanine-7-) methyltransferase	RNMT	1,68
218280_x_at	H2A histone family, member O	H2AFO	1,68
219778_at	zinc finger protein, multitype 2	ZFPM2	1,7
203725_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	1,71
205411_at	serine/threonine kinase 4	STK4	1,72
204961_s_at	neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1)	NCF1	1,75
205548_s_at	BTG family, member 3	BTG3	1,76
202600_s_at	nuclear receptor interacting protein 1	NRIP1	1,78
204389_at	monoamine oxidase A	MAOA	1,78
221371_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	TNFSF18	1,79
202241_at	tribbles homolog 1 (Drosophila)	TRIB1	1,8
205242_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)	CXCL13	1,81
205660_at	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL	1,81
202270_at	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	GBP1	1,83
203685_at	B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	1,83
209922_at	BRCA1 associated protein	BRAP	1,86
204352_at	TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	1,86
204103_at	chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4	1,88
204602_at	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1	1,89
221241_s_at	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)	BCL2L14	1,95
214405_at	Homo sapiens clone 23705 mRNA sequence		2,01
204269_at	pim-2 oncogene	PIM2	2,06
204533_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	2,11
209278_s_at	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	2,12
203324_s_at	caveolin 2	CAV2	2,13
204748_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	2,13

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
	(prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)		
218880_at	FOS-like antigen 2	FOSL2	2,19
203571_s_at	adipose specific 2	APM2	2,21
210661_at	glycine receptor, alpha 3	GLRA3	2,22
206942_s_at	pro-melanin-concentrating hormone	PMCH	2,24
215294_s_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	SMARCA1	2,26
205816_at	integrin, beta 8	ITGB8	2,29
205692_s_at	CD38 antigen (p45)	CD38	2,3
215017_s_at	formin binding protein 1-like	FNBP1L	2,35
220132_s_at	C-type lectin domain family 2, member D	CLEC2D	2,35
210528_at	major histocompatibility complex, class I-like sequence	HLALS	2,47
202431_s_at	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC	2,51
203875_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	SMARCA1	2,52
217123_x_at	pro-melanin-concentrating hormone-like 1	PMCHL1	2,52
207272_at	zinc finger protein 80 (pT17)	ZNF80	2,55
217518_at	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	FER1L3	2,56
219975_x_at	oleoyl-ACP hydrolase	OLAH	2,6
58916_at	potassium channel tetramerisation domain containing 14	KCTD14	2,7
200999_s_at	cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4	2,79
209960_at	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	HGF	2,83
205204_at	neuromedin B	NMB	2,9
213610_s_at	kelch-like 23 (Drosophila)	KLHL23	2,91
208548_at	interferon, alpha 6	IFNA6	3,01
210163_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	3,16
204655_at	chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	3,32
211122_s_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	3,37
207638_at	protease, serine, 7 (enterokinase)	PRSS7	3,37
201508_at	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	3,38
220723_s_at	hypothetical protein FLJ21511	FLJ21511	3,44
211126_s_at	cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	3,75
207030_s_at	cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	3,77
207932_at	interferon, alpha 8	IFNA8	4,01
211405_x_at	interferon, alpha 17	IFNA17	4,05
210656_at	embryonic ectoderm development	EED	4,13
219545_at	potassium channel tetramerisation domain containing 14	KCTD14	4,16
208259_x_at	interferon, alpha 7	IFNA7	4,31
207964_x_at	interferon, alpha 4	IFNA4	4,35
211338_at	interferon, alpha 2	IFNA2	4,36
208182_x_at	interferon, alpha 14	IFNA14	4,45

Affymetrix ID	Beschreibung	Gen	Regulation CpG (log2)
208344_x_at	interferon, alpha 13	IFNA13	4,48
214455_at	H2B histone family, member L	H2BFL	4,5
208261_x_at	interferon, alpha 10	IFNA10	4,54
211145_x_at	interferon, alpha 21	IFNA21	4,78
208448_x_at	interferon, alpha 16	IFNA16	5,2
208375_at	interferon, alpha 1	IFNA1	5,21
214569_at	interferon, alpha 5	IFNA5	5,21
208173_at	interferon, beta 1, fibroblast	IFNB1	5,39
207817_at	interferon, omega 1	IFNW1	5,47
212681_at	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	EPB41L3	5,76
1405_i_at	chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	6,16

Tabelle 7: Effekt der CD303-mAk-Behandlung auf die Genregulation CpG-stimulierter PDC nach 15 Stunden dargestellt als log2.

Affymetrix-ID	Beschreibung	Gen	CD303 Regulation (log2) in CpG-stimulierten PDC
214660_at	integrin, alpha 1	ITGA1	-5,01
220723_s_at	hypothetical protein FLJ21511	FLJ21511	-4,15
209278_s_at	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	-4,05
207272_at	zinc finger protein 80 (pT17)	ZNF80	-3,71
204475_at	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	-3,48
215436_at	Hydroxysteroid dehydrogenase like 2	HSDL2	-3,41
207286_at	centrosomal protein 135kDa	CEP135	-3,34
221606_s_at	nucleosomal binding protein 1	NSBP1	-3,29
216588_at	ribosomal protein L7	RPL7	-3,19
203501_at	plasma glutamate carboxypeptidase	PGCP	-2,72
215666_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	HLA-DRB4	-2,67
204995_at	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	CDK5R1	-2,59
201110_s_at	thrombospondin 1	THBS1	-2,4
217319_x_at	cytochrome P450, subfamily IVA, polypeptide 11	CYP4A11	-2,29
207817_at	interferon, omega 1	IFNW1	-2,23
204748_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	PTGS2	-2,22
204886_at	serine/threonine kinase 18	STK18	-2,21
220656_at	hypothetical protein PRO2435	PRO2435	-2,18
222219_s_at	transducin-like enhancer of split 6 (E(sp1) homolog, Drosophila)	TLE6	-2,18
221986_s_at	kelch-like 24 (Drosophila)	KLHL24	-2,16
214764_at	ribosomal RNA processing 15 homolog (S. cerevisiae)	RRP15	-2,1
206233_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	B4GALT6	-2,05
207932_at	interferon, alpha 8	IFNA8	-2,03
216631_s_at	Human HLA-SB alpha 2 pseudogene (DP-alpha)		-2,01
209277_at	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	-1,99
208375_at	interferon, alpha 1	IFNA1	-1,98
211338_at	interferon, alpha 2	IFNA2	-1,98
214569_at	interferon, alpha 5	IFNA5	-1,95
204932_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	TNFRSF11B	-1,9
207980_s_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	-1,88
208173_at	interferon, beta 1, fibroblast	IFNB1	-1,88
208548_at	interferon, alpha 6	IFNA6	-1,88
211145_x_at	interferon, alpha 21	IFNA21	-1,88
217513_at	chromosome 17 open reading frame 60	C17orf60	-1,87
209525_at	transmembrane 6 superfamily member 1	TM6SF1	-1,83
213908_at	WAS protein homology region 2 domain	WHDC1L1	-1,8

Affymetrix-ID	Beschreibung	Gen	CD303 Regulation (log2) in CpG-stimulierten PDC
	containing 1-like 1		
208344_x_at	interferon, alpha 13	IFNA13	-1,79
208261_x_at	interferon, alpha 10	IFNA10	-1,79
221973_at	Unnamed protein product		-1,64
208448_x_at	interferon, alpha 16	IFNA16	-1,63
210163_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	-1,63
211405_x_at	interferon, alpha 17	IFNA17	-1,63
218559_s_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B	MAFB	-1,59
208259_x_at	interferon, alpha 7	IFNA7	-1,58
208182_x_at	interferon, alpha 14	IFNA14	-1,57
215220_s_at	translocated promoter region	TPR	-1,55
1405_i_at	chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	-1,51
207964_x_at	interferon, alpha 4	IFNA4	-1,5
213821_s_at	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)	IDS	-1,48
221221_s_at	kelch-like 3 (Drosophila)	KLHL3	-1,47
212957_s_at	cDNA DKFZp434F172		-1,46
212463_at	CD59 molecule, complement regulatory protein	CD59	-1,45
211122_s_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11	-1,44
221085_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	TNFSF15	-1,44
204655_at	chemokine (C-C motif) ligand 5	CCL5	-1,42
207030_s_at	cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	-1,41
207011_s_at	PTK7 protein tyrosine kinase 7	PTK7	-1,41
220039_s_at	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	CDKAL1	-1,39
213479_at	neuronal pentraxin II	NPTX2	-1,37
214132_at	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	ATP5C1	-1,37
205773_at	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3	CPEB3	-1,32
219607_s_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	MS4A4A	-1,31
215017_s_at	formin binding protein 1-like	FNBP1L	-1,3
221156_x_at	cell cycle progression 8 protein	CPR8	-1,28
205204_at	neuromedin B	NMB	-1,27
215294_s_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	SMARCA1	-1,27
201849_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	-1,26
202933_s_at	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1	YES1	-1,26
213194_at	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)	ROBO1	-1,26
201508_at	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	-1,25
210035_s_at	ribosomal protein L5	RPL5	-1,24
206665_s_at	BCL2-like 1	BCL2L1	-1,23

Affymetrix-ID	Beschreibung	Gen	CD303 Regulation (log2) in CpG-stimulierten PDC
207610_s_at	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 2	EMR2	-1,23
213042_s_at	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	ATP2A3	-1,23
219174_at	capillary morphogenesis protein 1	CMG1	-1,23
202336_s_at	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	PAM	-1,22
203874_s_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	SMARCA1	-1,22
209537_at	exostoses (multiple)-like 2	EXTL2	-1,22
213212_x_at	cDNA FLJ33459 fis		-1,22
204233_s_at	choline kinase	CHK	-1,2
208208_at	myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle	MYH13	-1,19
207057_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7	SLC16A7	-1,18
213267_at	dopey family member 1	DOPEY1	-1,17
203680_at	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta	PRKAR2B	-1,16
206020_at	suppressor of cytokine signaling 6	SOCS6	-1,16
207417_s_at	zinc finger protein 177	ZNF177	-1,14
204642_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	EDG1	-1,1
211126_s_at	cysteine and glycine-rich protein 2	CSRP2	-1,1
221561_at	sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1	SOAT1	-1,1
219312_s_at	zinc finger protein RINZF	RINZF	-1,1
205565_s_at	Friedreich ataxia	FRDA	-1,09
206667_s_at	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	-1,08
215838_at	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 7	ILT11	-1,08
209960_at	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	HGF	-1,07
206003_at	centrosomal protein 135kDa	CEP135	-1,07
215859_at	nicalin homolog (zebrafish)	NCLN	-1,07
218694_at	ALEX1 protein	ALEX1	-1,07
212334_at	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)	GNS	-1,06
212681_at	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	EPB41L3	-1,06
214101_s_at	aminopeptidase puromycin sensitive	NPEPPS	-1,06
203820_s_at	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	IGF2BP3	-1,05
210005_at	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	GART	-1,04
218668_s_at	RAP2C, member of RAS oncogene family	RAP2C	-1,04
205207_at	interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	-1,03
213388_at	similar to phosphodiesterase 4D interacting protein isoform 2	LOC727942	-1,03
201436_at	eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E	-1,02
218602_s_at	family with sequence similarity 29, member A	FAM29A	-1,02

Affymetrix-ID	Beschreibung	Gen	CD303 Regulation (log2) in CpG-stimulierten PDC
203598_s_at	WW domain binding protein 4 (formin binding protein 21)	WBP4	-1,01
205632_s_at	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	PIP5K1B	-1,01
206710_s_at	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	EPB41L3	-1
205092_x_at	zinc finger and BTB domain containing 1	ZBTB1	-1
206978_at	chemokine (C-C motif) receptor 2	CCR2	0,99
216118_at	cDNA FLJ12365		0,99
220596_at	G patch domain containing 4	GPATCH4	0,99
214229_at	dynein, axonemal, heavy polypeptide 17	DNAH17	1
210136_at	myelin basic protein	MBP	1
205418_at	feline sarcoma oncogene	FES	1,01
211796_s_at	T cell receptor beta locus	TRB	1,03
221815_at	abhydrolase domain containing 2	ABHD2	1,03
204867_at	GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein	GCHFR	1,04
214318_s_at	furry homolog (Drosophila)	FRY	1,04
222079_at	ESTs		1,05
210139_s_at	peripheral myelin protein 22	PMP22	1,06
212384_at	HLA-B associated transcript 1	BAT1	1,06
204037_at	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	EDG2	1,09
209399_at	holocarboxylase	HLCS	1,1
214637_at	oncostatin M	OSM	1,1
217706_at	ESTs, Weakly similar to neuronal thread protein		1,11
222071_s_at	solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	SLCO4C1	1,11
220663_at	interleukin 1 receptor accessory protein-like 1	IL1RAPL1	1,12
214798_at	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 2	ATP2C2	1,13
204769_s_at	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	TAP2	1,14
215695_s_at	glycogenin 2	GYG2	1,15
215051_x_at	allograft inflammatory factor 1	AIF1	1,16
216641_s_at	ladinin 1	LAD1	1,17
215152_at	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	MYB	1,18
219726_at	neuroligin 3	NLGN3	1,18
204661_at	CDW52 antigen (CAMPATH-1 antigen)	CDW52	1,19
210778_s_at	MAX dimerization protein 4	MXD4	1,2
211422_at	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3	TRPM3	1,21
217700_at	Protein Associated with Tlr4	MGC40499	1,22
205798_at	interleukin 7 receptor	IL7R	1,25
219285_s_at	ninein (GSK3B interacting protein)	NIN	1,25
205285_s_at	FYN binding protein (FYB-120/130)	FYB	1,29
211340_s_at	melanoma cell adhesion molecule	MCAM	1,29

Affymetrix-ID	Beschreibung	Gen	CD303 Regulation (log2) in CpG-stimulierten PDC
203780_at	epithelial V-like antigen 1	EVA1	1,31
214915_at	FLJ25476 protein	FLJ25476	1,32
203760_s_at	Src-like-adaptor	SLA	1,34
214133_at	mucin 6, gastric	MUC6	1,34
215516_at	laminin, beta 4	LAMB4	1,34
213072_at	cysteine/histidine-rich 1	CYHR1	1,36
204531_s_at	breast cancer 1, early onset	BRCA1	1,38
214558_at	G protein-coupled receptor 12	GPR12	1,41
214985_at	Homo sapiens clone 24739 mRNA sequence		1,41
201373_at	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	PLEC1	1,44
215123_at	KIAA0220 protein	KIAA0220	1,48
202152_x_at	upstream transcription factor 2, c-fos interacting	USF2	1,52
212654_at	tropomyosin 2 (beta)	TPM2	1,56
216374_at	BAC clone RP11-155J5 from Y		1,6
203264_s_at	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	ARHGEF9	1,65
207788_s_at	vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1)	SCAM-1	1,65
208146_s_at	carboxypeptidase, vitellogenic-like	CPVL	1,66
208472_at	IKAROS family zinc finger 4 (Eos)	IKZF4	1,67
222375_at	ESTs, Moderately similar to hypothetical protein FLJ20234		1,75
216180_s_at	synaptojanin 2	SYNJ2	1,79
201796_s_at	valyl-tRNA synthetase	VAR5	1,86
207220_at	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	ART4	1,96
217489_s_at	interleukin 6 receptor	IL6R	2,02
211993_at	protein kinase, lysine deficient 1	PRKWINK1	2,09
210612_s_at	synaptojanin 2	SYNJ2	2,37
217655_at	FXD domain containing ion transport regulator 5	FXD5	2,39
221724_s_at	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 6	CLECSE6	2,44
210461_s_at	actin binding LIM protein 1	ABLIM1	2,63
214319_at	furry homolog (Drosophila)	FRY	2,85
205856_at	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)	SLC14A1	3,16
214450_at	cathepsin W (lymphopain)	CTSW	3,25
208215_x_at	dopamine receptor D4	DRD4	3,54
217535_at	ESTs, Weakly similar to hypothetical protein FLJ20489		4,54

Danksagung

Meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. R. Küppers danke ich für seine vielfältige Förderung, engagierte Unterstützung und sehr kompetente Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. J. Schmitz danke ich für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit die Arbeit in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung von Miltenyi Biotec durchzuführen und für seine kompetente Betreuung.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn G. Winkels für die sehr kompetente Betreuung der Arbeit. Den zahlreichen Gesprächen und seinen wertvollen Anregungen ist das Gelingen dieser Arbeit zu verdanken. Herr Winkels Vertrauen und seine freundschaftliche Unterstützung haben mich stets motiviert, und ich werde weiterhin gerne an diese produktive Zeit zurückdenken.

Für die große Hilfsbereitschaft, für das nette Arbeitsklima und für die freundliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei J. Möbius, J. Fischer, B. Kolbe, S. Kaden, S. Schmucker, T. Völkel sowie A. Hoch bedanken.

Allen Mitarbeitern der Abteilung, die mich direkt oder indirekt unterstützt haben, möchte ich an dieser Stelle ebenso danken.

Bei meinen Freunden – insbesondere bei meiner Familie – möchte ich mich für ihr Verständnis und Vertrauen während meiner Promotion bedanken.

Lebenslauf

Name: Jürgen Röck
Geburtsdatum: 29.01.1971
Geburtsort: Köln

Ausbildung und beruflicher Werdegang:

1977 – 1981	Grundschule, Andernach
1981 – 1991	Bertha-von-Suttner-Gymnasium, Andernach Abschluß: Abitur
1991 – 1993	Magisterstudium Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
1993 – 1994	Magisterstudium Glasgow University, Schottland
1994 – 1996	Rheinische Akademie e.V., Köln Abschluß: Biologisch-Technischer-Assistent
1996 – 2002	Studium der Biologie an der Universität zu Köln Abschluß: Diplom
seit 2002	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. R. Küppers in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach sowie Anstellung bei Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „ CD303 (BDCA-2): Funktionelle Charakterisierung eines spezifischen C-Typ-Lektins humaner plasmacytoider dendritischer Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Röck befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. R. Küppers

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

J. Röck

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

J. Röck